

Synthese geschützter TPA–Spinlabel für die Markierung von Nukleinsäuren und Proteinen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaft

vorgelegt beim Fachbereich 14
für Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe–Universität
in Frankfurt am Main

von

Frank Kaiser

aus Bad Soden am Taunus

Frankfurt 2023

(D30)

Vom Fachbereich 14 für Biochemie, Chemie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: 1. Gutachter: Prof. Dr. Michael W. Göbel
2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Datum der Disputation:

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. M. W. Göbel für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit meine Promotion in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Zudem danke ich ihm für die zahlreichen Ideen, Beantwortung meiner Fragen und der Betreuung während dieser Zeit.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. H. Schwalbe dafür danken, dass er die Erstellung des Zweitgutachtens übernimmt.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danken. Besonders danke ich hier Sandra Weber, Dennis Krug, Catharina Kost, Alexander Kaiser, Felix Zellmann, Timo Weinrich, Mariano Goldberg, Mathias Bolz, Jan Hornung, Konstantinos Chionis, Elisabeth Kalden und Dr. Ute Scheffer. Neben Ratschlägen und Klärungen einiger Belange des Laboralltages sowie bei der Durchführung von Experimenten, haben sie immer für eine gute und lustige Arbeitsatmosphäre während meiner Arbeit gesorgt. Es fällt mir sehr schwer dieses Kapitel abzuschließen.

Fürderhin möchte ich noch all meinen Bachelor- und Masterstudenten danken, die mich auf diesem Weg unterstützten. Es herrschte stets ein lustiges Miteinander und es war mir immer eine Freude mit euch zusammen zu arbeiten.

Zuletzt möchte ich mich auch noch bei meiner Familie bedanken, durch die mir mein Studium erst ermöglicht wurde.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aptamere.....	2
1.2	Ribozyme	4
1.3	Strukturbestimmung	5
1.4	EPR–Spektroskopie.....	10
1.4.1	cw–EPR–Spektroskopie	10
1.4.2	PELDOR–Spektroskopie	15
1.5	Spinlabel für Nukleinsäuren und Proteine	22
1.5.1	Metallionen als Spinlabel für EPR.....	22
1.5.2	Triarylmethylradikale als Spinlabel für EPR.....	25
1.5.3	Nitroxidradikale als Spinlabel für EPR	26
1.5.3.1	Strukturelle Merkmale von Nitroxidradikalen.....	26
1.5.3.2	Linkerdesign.....	28
1.5.3.3	Einbau und Position von Spinlabeln	29
2	Zielsetzung.....	40
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Spinlabel für den Einsatz in der RNA–Festphasensynthese	41
3.1.1	Uridinbaustein	41
3.1.2	Cytidinbaustein.....	55
3.1.3	Einbau des Uridinbausteins 31 in verschiedene RNAs	59
3.1.4	Zusammenfassung und Ausblick	65
3.2	Spinlabel für den Einsatz in Proteinen	68
3.2.1	Geschütztes Lysinderivat.....	68
3.2.2	Spinlabel zum „Clicken“	73
3.2.3	Geschütztes Phenylalaninderivat	81
4	Experimenteller Teil	99
4.1	Allgemeine Anmerkungen	99
4.2	Synthesen	101
4.3	Synthese, Reinigung und Quantifizierung von RNA	175
4.4	Photochemische Entschützung	178
4.5	Duplex–versus Hairpinstabilität des palindromischen Oligonukleotids III.....	180
4.6	Cy5–Markierung und in–line probing.....	181
4.7	EPR–Messungen	184
4.8	Schmelzpunktmessungen.....	188
5	Literatur.....	192

6	Abbildungsverzeichnis	220
7	Tabellenverzeichnis	226
8	Eidesstattliche Erklärung	227
9	Publikationsliste	228
10	Lebenslauf	229

1 Einleitung

Nukleotide und Aminosäuren sind die Grundbausteine, auf ihnen fußt das Leben, nichts funktioniert ohne sie. Die Desoxyribonukleinsäure (DNA), Bewahrer des Genotyps, ist aus Nukleotiden aufgebaut ebenso wie die Ribonukleinsäure (RNA) (siehe Abbildung 1).

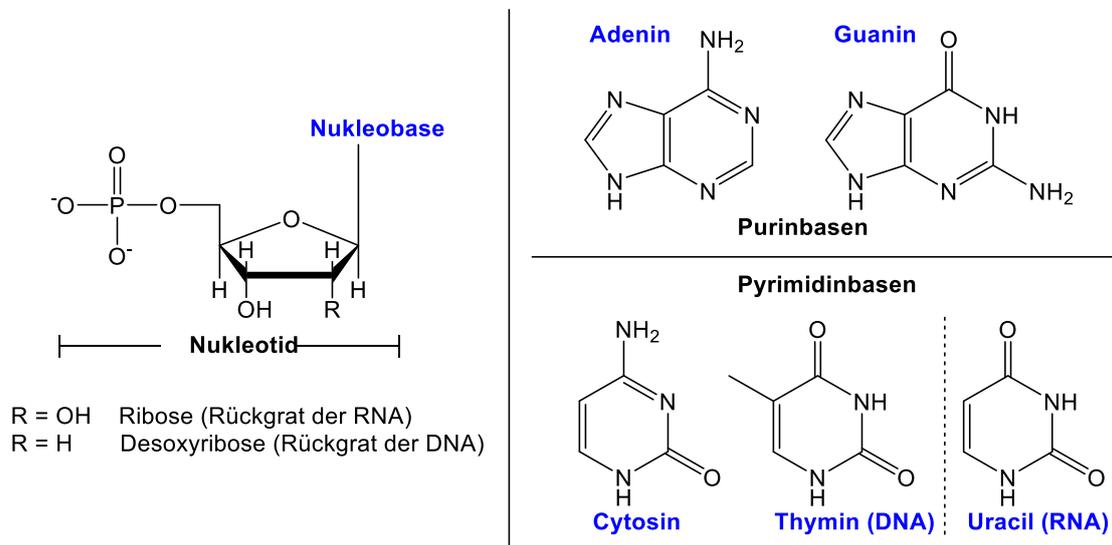


Abbildung 1: Struktur der Nukleotide, die sich aus einem Phosphat, einer Nukleobase und einer Pentose zusammensetzt (links). Im Falle der RNA wird die Ribose verwendet und im Falle der DNA die Desoxyribose. Die Nukleobasen lassen sich in Purinbasen (rechts oben) und Pyrimidinbasen (rechts unten) unterteilen. RNA und DNA unterscheiden sich bei den Basen in der Verwendung von Thymin (DNA) und Uridin (RNA).¹

Im klassischen Bild des Informationsflusses erfüllt die RNA viele wichtige Aufgaben, um die in der DNA gespeicherten Erbinformationen in Proteine, welche aus Aminosäuren bestehen und die Hälfte der Trockenmasse einer Zelle ausmachen² zu übersetzen. Hierfür wird die DNA zunächst in die messenger RNA (mRNA) transkribiert. Die mRNA wird daraufhin durch das Ribosom, welches aus ribosomaler RNA (rRNA) und Proteinen besteht, in das entsprechende Protein translatiert, wofür noch eine Transfer-RNA (tRNA) benötigt wird. Die tRNA liefert die benötigten Aminosäuren an das Ribosom. Neben den Aufgaben in der Proteinbiosynthese findet man sie noch in vielen anderen Bereichen. Beispielsweise können RNA-Aptamere³ spezifische Moleküle erkennen oder Ribozyme⁴ Strangspaltung katalysieren. Die Aktivität von Nukleinsäuren und Proteinen basiert jedoch nicht allein auf der Abfolge, in welcher Nukleotide bzw. Aminosäuren miteinander verknüpft sind (Primärsequenz). Ein wesentlicher Aspekt sind die 3D-Strukturen, die durch Faltung eingenommen werden können. Diese basieren auf Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bausteinen. Hauptsächlich wären dies Wasserstoffbrücken im allgemeinen, π - π -Wechselwirkungen und Basenpaarungen (Watson-Crick, Wobble, Hoogsteen, etc.).¹ In den nun folgenden Kapiteln soll eine Einführung in zwei Klassen funktioneller Nukleinsäuren Aptamere und Ribozyme gegeben werden, um die Wichtigkeit von Strukturierung hervorzuheben.

1.1 Aptamere

Aptamere sind kurzkettige Oligonukleotide, meist mit einer Kettenlänge von 20 – 80 Nukleotiden, die über ihre dreidimensionale Struktur ein spezifisches Zielmolekül mit hoher Affinität erkennen und binden können (siehe Abbildung 2). Die Zielmoleküle von Aptameren können von mannigfaltiger Art sein, so gibt es Beispiele für Ionen, Proteine, Cofaktoren, Aminosäuren, Antibiotika, Bakterien und eukaryotische Zellen.^{3,5-13} Erstmals erwähnt 1990 wurde die Bezeichnung „Aptamer“, was so viel wie „passendes Teil“ bedeutet, durch Ellington und Szostak geprägt.³ Aptamere bilden das Pendant zu den aminosäurebasierenden Antikörpern. Die Dissoziationskonstanten von Aptameren liegen wie bei Antikörper im pico–nanomolaren Bereich^{14,15}, gleichzeitig besitzen Aptamere mehrere Vorteile den Antikörpern gegenüber. Geringe Produktionskosten, leicht umzusetzende Modifizierungen sowie Konstanz bei Qualität und Homogenität des Produkts zeichnen Aptamere aus. Zudem sind sie thermisch stabil und können länger gelagert werden. Zumeist sind sie nicht–toxisch und nicht–immunogen im Gegensatz zu Antikörpern, deren Anwendung zu unvorhersehbaren Immunreaktionen führen kann.¹⁴

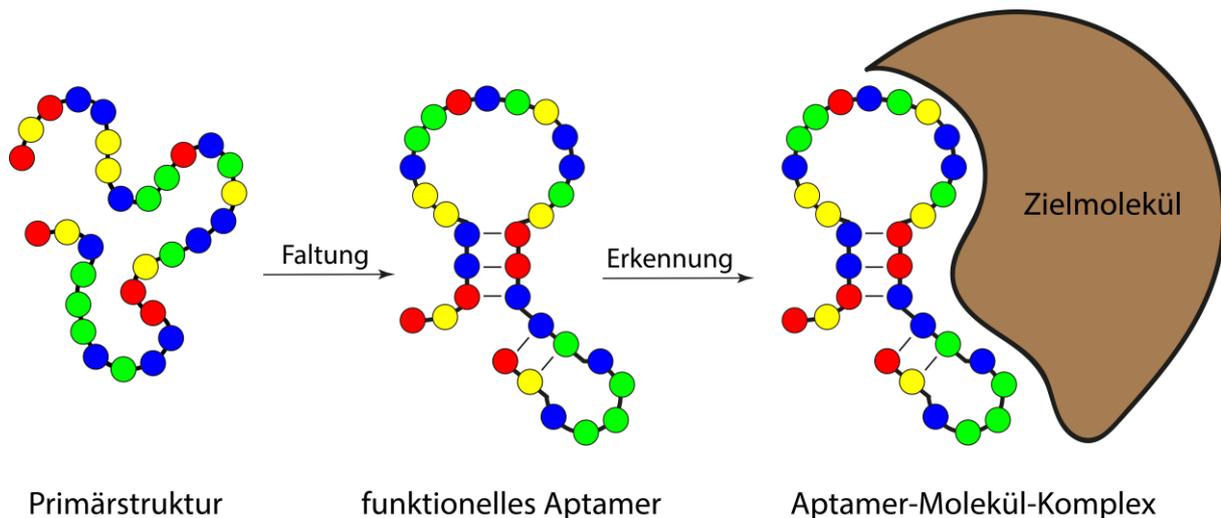


Abbildung 2: Prinzip der Funktionsweise eines Aptamers. Entlehnt aus Stoltenburg, Reinemann *et al.*¹⁵.

Der Großteil der heute bekannten Aptamere wurde mit der SELEX–Methode (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung) gefunden. SELEX wurde 1990 von Tuerk und Gold etabliert.¹⁶ Sie nutzten sie, um RNAs zu identifizieren, die an die Bakteriophage–T4–DNA–Polymerase binden können. Startpunkt eines jeden SELEX–Prozesses ist die DNA– oder RNA–Bibliothek. Diese besteht aus bis zu 10^{15} unterschiedlicher Sequenzen. Diese Sequenzen besitzen einen zentralen randomisierten Abschnitt (zwischen 20 und 80 Nukleotide umfassend), welcher zum Zwecke der Amplifizierung von zwei Primerregionen (zwischen 18 und 21 Nukleotide lang) flankiert wird. Das Molekül, welches binden soll, wird nun mit der Bibliothek inkubiert. Die Zielmoleküle sind hierbei immobilisiert z.B. an magnetic beads. Anschließend werden bindende und nicht–bindende Spezies

voneinander getrennt und die bindenden danach eluiert. Nun werden die Oligonukleotide vervielfältigt und können in einer nächsten SELEX-Runde eingesetzt werden. Die Amplifizierung findet bei DNA mittels PCR statt, und im Falle von RNA erfolgt sie mit RT-PCR und T7-Transkription. Je nach Bedingungen sind mehrere Zyklen nötig, um bindende Aptamere zu isolieren. Nach dem letzten Zyklus werden die gefundenen Sequenzen sequenziert. Der SELEX-Prozess ist schematisch in Abbildung 3 gezeigt.

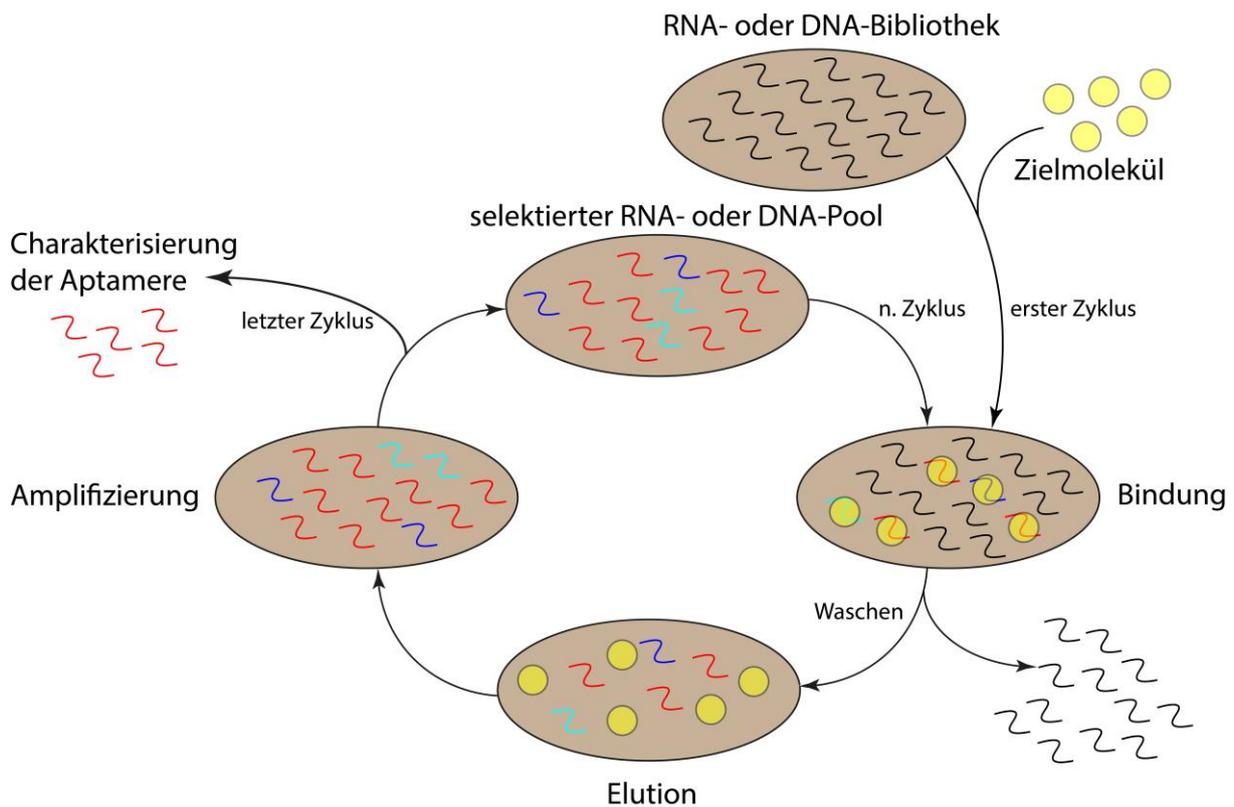


Abbildung 3: Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.

Die Anwendungsgebiete von Aptameren sind vielfältig. Sie wurden vielfach als Diagnostikum eingesetzt z.B. bei Krebs¹⁷, Krankheitserregern^{18,19}, zur Überwachung von Umweltverschmutzung^{20,21} und als Stammzellenmarker²². Sie werden aber auch als Biosensoren^{23,24} und Therapeutika^{25,26} verwendet.

1.2 Ribozyme

Über viele Jahre, bis in die 1980er Jahre hinein, waren ausschließlich Proteine als biologische Katalysatoren bekannt. Erst 1982 gelang der Gruppe um Thomas Cech der Beweis mit einem aus *Tetrahymena thermophila* stammenden rRNA-Segment, dass dieses ohne Hilfe von Proteinen katalytisch aktiv ist.²⁷ Über die Jahre sind viele weitere Ribozyme^{28–31} entdeckt worden, wobei der bekannteste Vertreter wohl das Ribosom ist. Gleichzeitig bildet das Ribosom bei welchem seit Ende 2000 bekannt, dass es ein Ribozym ist³², eine Ausnahme hinsichtlich seiner Funktion. Wo andere Ribozyme typischerweise die Spaltung bzw. die Ligation von RNA katalysieren^{33–36}, verknüpft das Ribosom während der Proteinbiosynthese die einzelnen Aminosäuren miteinander.

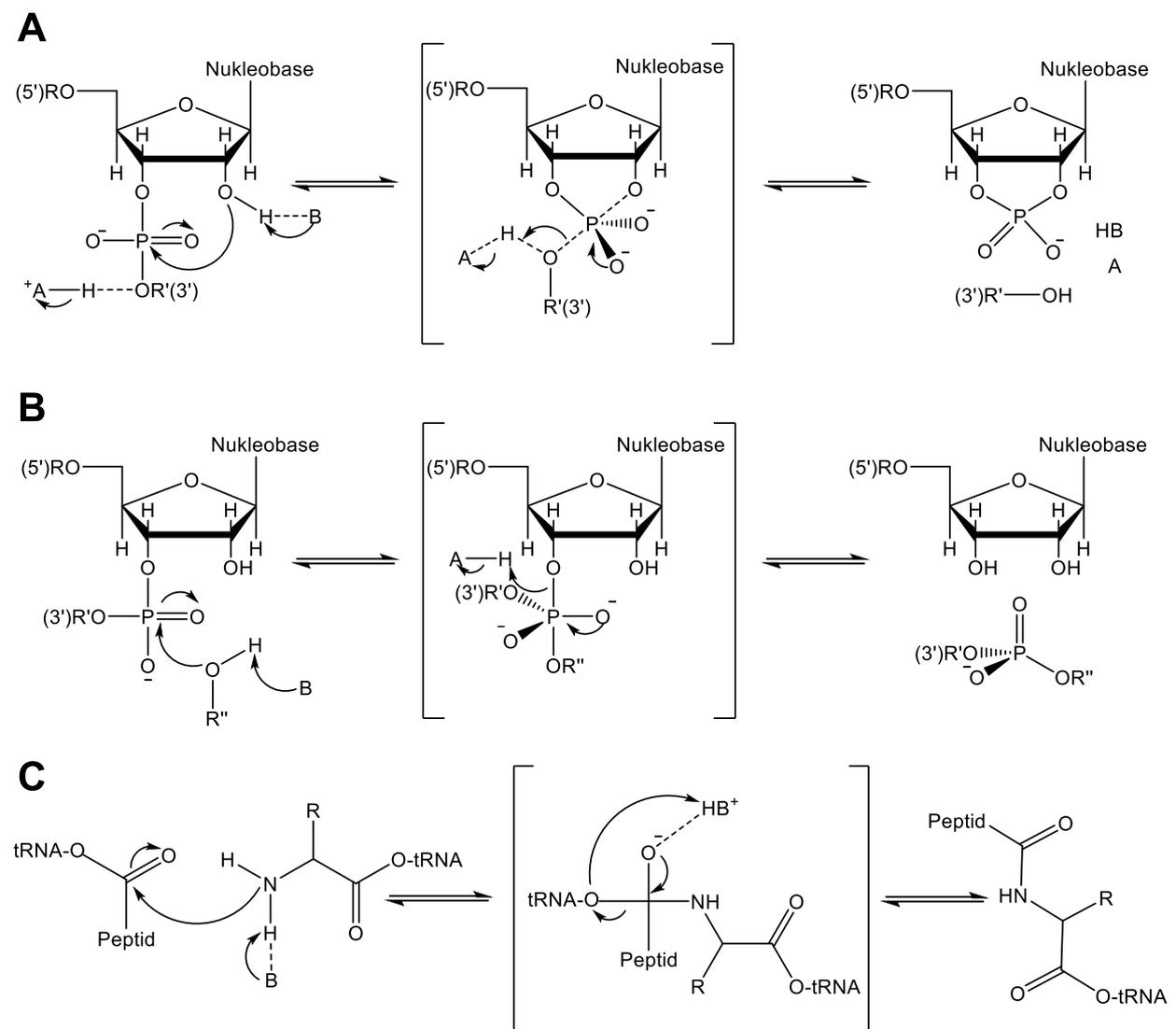


Abbildung 4: Übersicht der bisher entdeckten Ribozymgruppen. Die Einteilung der Ribozyme richtet sich nach dem vorgeschlagenen Spaltungsmechanismus **A**: Zeigt die intramolekulare Spaltung über einen nukleophilen Angriff der benachbarten 2'-OH-Gruppe an das 3'-5'-Phosphordiesterrückgrat unter Bildung einer freien 5'-OH-Gruppe und eines 2'-3'-Cyclophosphats. Dieser Spaltungsmechanismus wird bei kleinen Ribozymen, wie dem Hammerhead-Ribozym gefunden.³⁷ **B**: Große Ribozyme wie selbst-splicende Introns spalten mittels eines intermolekularen Phosphoryl-Transfer. R'' repräsentiert hier entweder Wasser oder eine Ribose, in Abhängigkeit des Ribozyms.³⁸ **C**: Aminolyse unter Bildung einer Peptidbindung, welche im Ribosom stattfindet.³²

Die unterschiedlichen Ribozyme lassen sich anhand ihrer Mechanismen in drei Gruppen unterteilen (siehe Abbildung 4). Wegen der intrinsischen Stabilitätsproblemen einzelsträngiger RNA wurde versucht, die katalytischen Eigenschaften auf DNA auszuweiten. 1994 wurden hierzu das erste DNAzyme bzw. Desoxyribozym von Breaker und Joyce vorgestellt.³⁹ Da sie nicht natürlich vorkommen⁴⁰, stammen sie aus Selektions-Prozessen wie SELEX und werden in einem breiten Bereich eingesetzt.^{41,42}

1.3 Strukturbestimmung

Damit Nucleinsäuren aber auch Proteine ihre diversen Aufgaben in der Zelle erfüllen können, müssen sie sich in komplexe Strukturen falten können. Um nun zu verstehen, nach welchem Mechanismus diese funktionieren, ist es essenziell deren zwei- und dreidimensionale Struktur zu kennen, wofür es unterschiedliche Ansätze gibt. Der wohl einfachste Weg besteht in den zahlreichen computergestützten Methoden, um Strukturen vorauszusagen. Viele Anwendungen basieren hierbei auf thermodynamischen Parametern⁴³, Wahrscheinlichkeiten^{44,45} oder Scoringssystemen⁴⁶, um eine optimal gefaltete RNA zu bestimmen, lassen aber den Faltungsprozess außer Acht. Methoden, welche die Kinetik der Faltung berücksichtigen, liefern tendenziell bessere Ergebnisse.⁴⁷ Nichtsdestotrotz sind *in silico* Methoden durch die exponentielle zunehmende Rechenleistung bei zunehmender Sequenzlänge limitiert. Außerdem ist problematisch, dass es in den wenigsten Fällen nur eine plausible Struktur gibt und möglicherweise nur eine dieser Strukturen biologisch aktiv ist.⁴⁷ Zudem ist eine Voraussage noch kein Beweis für ihr tatsächliches Vorhandensein. Es ist somit notwendig weitere Methoden zur Hand zu haben. Hauptsächlich für Sekundärstrukturen wären hier *in-line* probing, das Markieren einzelner frei zugänglicher Nucleinsäuren (*chemical probing*) und Quervernetzung mit anschließender Ligation zu nennen. Beim *in-line* probing macht man sich die unterschiedlich schnell verlaufende Hydrolyse der RNA in Abhängigkeit zu ihrer eingenommenen Struktur zu Nutze. Während der Hydrolyse greift die 2'-OH-Gruppe den benachbarten Phosphor des Rückgrates nukleophil an, wenn Nucleophil und Abgangsgruppe eine *in-line* Konformation einnehmen, sprich ein Winkel von 180° muss eingehalten werden. Wegen der höheren Flexibilität einzelsträngiger RNA ist die *in-line* Konformation dort leichter einzunehmen, was sich in einer gesteigerten Spaltungseffizienz für diese Position bemerkbar macht. Im Vergleich dazu weisen strukturierte Bereiche der RNA wenig bis keine Spaltung auf, da es unwahrscheinlicher ist, dass eine *in-line* Konformation vorliegt.⁴⁸ Beim *chemical probing* verwendet man kleine Moleküle, die die RNA strukturspezifisch modifizieren. Die kleinen Moleküle werden in zwei Klassen unterteilt, je nachdem, ob sie die Nucleobase oder das Riboserückgrat modifizieren (siehe Abbildung 5). Im ersten Schritt wird die strukturierte RNA mit dem

Reagenz inkubiert. Beispielsweise kann Dimethylsulfat (DMS) das N1 von Adenin und das N3 von Guanosin methylieren.⁴⁹ Dies betrifft jedoch nur Nukleobasen, die ungepaart vorliegen, als Basenpaar am Anfang oder Ende einer Helix lokalisiert sind oder als Basenpaar von einem GU–Wobblebasenpaar flankiert sind.⁴⁹ Zielt man jedoch auf das Rückgrat, so wird in den meisten Fällen ein Acylierungsreagenz verwendet, um die 2'–OH–Gruppe zu modifizieren. Anschließend erfolgt mittels reverser Transkriptase die Überführung in DNA, um analysiert zu werden. Die eingeführten Modifikationen stören jedoch die Transkriptase, so dass es zum Abbruch der Transkription an dieser Stelle kommt. So können freiliegende Nukleotide identifiziert werden. Basenpaarungen können auf diese Weise jedoch nicht bestimmt werden, hierfür ist das Crosslinking mit anschließender Ligation besser geeignet.⁵⁰

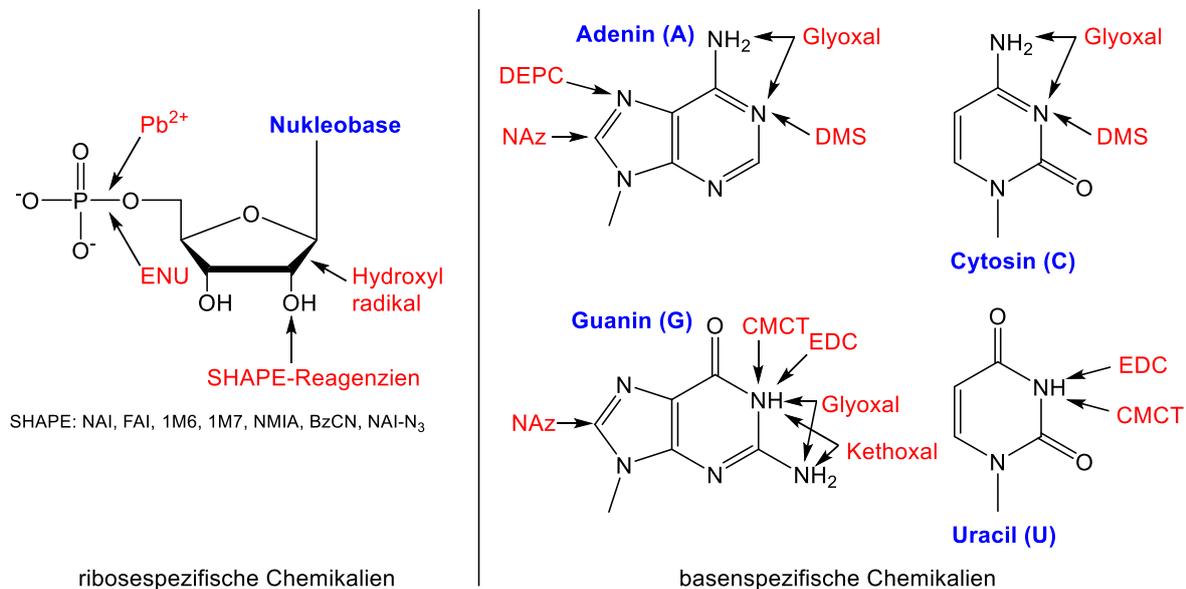


Abbildung 5: Verschiedene Reagenzien für das chemical probing und die entsprechenden Reaktionspartner/orte. **1M6:** 1-Methyl-6-nitroisatsäureanhydrid; **1M7:** 1-Methyl-7-nitroisatsäureanhydrid; **BzCN:** Benzylcyanid; **CMCT:** *N*-Cyclohexyl-*N'*-(β -[*N*-methylmorpholin]ethyl)carbodiimid-*para*-toluolsulfonat; **EDC:** 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid; **DEPC:** Diethylcarbonat; **ENU:** *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff; **NAz:** Nicotinoylatid; **DMS:** Dimethylsulfat; **NAI:** (1*H*-imidazol-1-yl)(2-methylpyridin-3-yl)methanon; **FAI:** (1*H*-imidazol-1-yl)(2-methylfuran-3-yl)methanon; **NMIA:** 1-Methyl-2*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-2,4(1*H*)-dion; Die Grafik basiert auf Wang, Liu *et al.*⁵⁰

Beim Crosslinking werden zunächst die RNA–Stränge, die miteinander Basenpaare ausbilden, kovalent vernetzt. Anschließend wird mittels RNase einzelsträngige RNA abgebaut und benachbarte 5'–3'–Enden ligiert. Danach wird das Crosslinking umgekehrt sowie ein Primer für die Reversetranskriptase ligiert. Nach dem Überführen des RNA–Templats in DNA kann diese nach dem Amplifizieren sequenziert werden (siehe Abbildung 6).

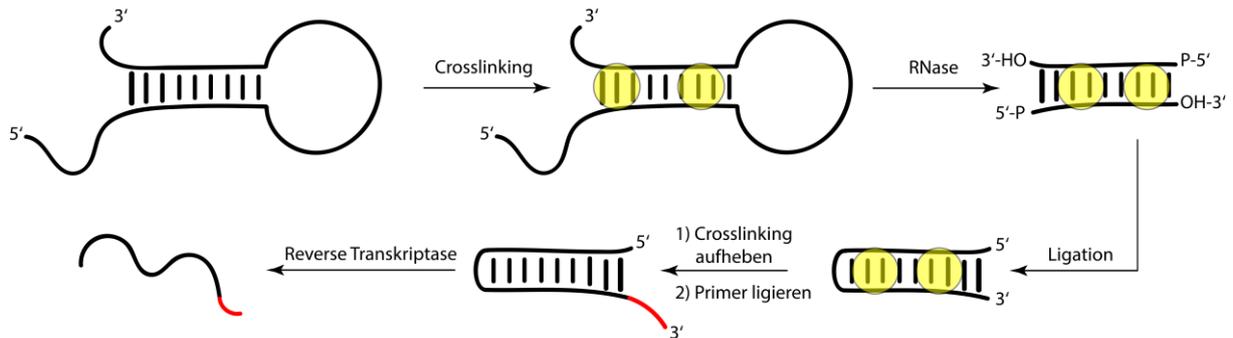


Abbildung 6: Prinzip des Crosslinking mit anschließender proximity-Ligation zur Bestimmung von Basenpaarungen.⁵¹

Zur Bestimmung von dreidimensionalen Strukturen und Dynamiken sind die oben beschriebenen Methoden schlecht bis nicht geeignet. Stattdessen werden hauptsächlich Methoden wie Elektronenmikroskopie, Röntgenstrukturanalyse und NMR zur Aufklärung eingesetzt. Der Großteil der

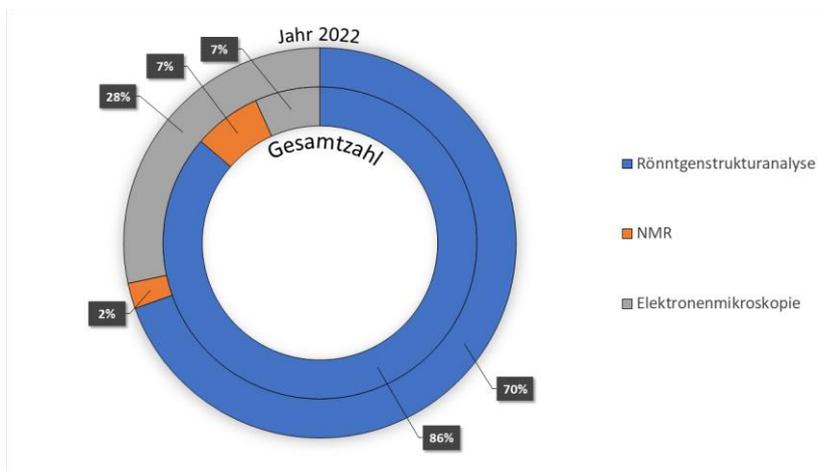


Abbildung 7: Relativer Anteil an gelösten Strukturen für Elektronenmikroskopie, NMR und Röntgenstrukturanalyse. Gezeigt sind die Daten seit Bestehen der PDB und für das Jahr 2022 (Stand: 28.11.2022)

publizierten Daten stammt mit 86% aus Röntgenstrukturanalysen (siehe Abbildung 7)⁵², wobei deren relativer Anteil in den letzten Jahren stetig rückläufig war, da die Elektronenmikroskopie an Popularität gewann. Nichtsdestotrotz ist die Röntgenstrukturanalyse eine potente Methode zur

Lösung von Strukturen, da sie eine recht genaue Bestimmung der Atompositionen unabhängig der Größe der Zielstruktur zulässt. Es konnten bereits Auflösungen von 0.5 Å und kleiner erreicht werden.^{53,54} Diese sind jedoch bei Proteinen erzielt worden. Nukleinsäuren sind deutlich flexibler, sodass hier die Auflösung schlechter ist. Voraussetzungen sind jedoch große (0.5 – 1.0 mm) Proteinkristalle, die hoch geordnet sein müssen. Flexible Bereiche können oft nicht aufgelöst werden, da die Elektronendichte über einen großen Bereich verteilt vorliegt.^{55,56} Auch ist der Prozess der Kristallisation schwierig hinsichtlich der Stabilität des Proteins und der Kristallisationsbedingungen und bedarf großen Geschicks seitens des Experimentators.⁵⁷ Problematisch ist auch, dass der vermessene Kristall häufig einen postkatalytischen Zustand darstellt und so den Zugang zu molekularen Prozessen erschwert. Dieses Problem wurde mittels der X-ray Free Electron Laser (XFEL) behoben. Bei dieser Methode wird ein gepulster Femtosekundenlaser verwendet. Eine Vielzahl kleiner Proteinkristalle in der Größenordnung von Mikrometern⁵⁸ wird dabei durch den Laserstrahl geleitet. Jeder Kristall

ergibt ein Beugungsmuster, bevor er zerstört wird. Ein kompletter Datensatz besteht somit aus tausenden einzelner Beugungsmuster, welche kombiniert werden können. Somit sind zeitaufgelöste Messungen von Moleküldynamiken möglich.⁵⁹ Die Untersuchung mittels NMR ist eine weitere Möglichkeit, Strukturen und Dynamiken zu erforschen. Anders als bei der Röntgenstrukturanalyse wird die Probe in Lösung vermessen und ist nicht in einem Gitter gebunden. Daher ist NMR die wichtigste Methode, wenn es sich um die Aufklärung atomarer Strukturen in besonders flexiblen Bereichen des Zielmoleküls handelt. Auch sind Untersuchungen in Zellen möglich, so dass Proteine und Nukleinsäuren in einer physiologischen Umgebung vermessen werden können.^{60,61} Aktuell ist die Methode noch durch die Größe der untersuchbaren Zielstrukturen limitiert, was an der Signalüberlagerung im Spektrum liegt.

Durch kürzliche Fortschritte in der Elektronenmikroskopie konnte eine Methode namens single-particle cryo-EM entwickelt werden. Mit dieser Methode sind jetzt auch Zielmoleküle zugänglich, die vorher auf Grund ihrer Größe bzw. ihrer Flexibilität weder für NMR noch für Röntgenstrukturanalysen zugänglich waren. Es werden viele einzelne zweidimensionale Bilder des Makromoleküls in unterschiedlichen Orientierungen aufgenommen. Diese Bilder können anschließend zu einer dreidimensionalen Struktur zusammengesetzt werden. Typischerweise liegen die Auflösungen bei der cryo-EM unter der der Röntgenstrukturanalyse. Es sind jedoch schon Strukturen publiziert worden, deren Genauigkeit bei 1.5 Å liegen, was für die Bestimmung von Atompositionen ausreichend ist.⁶² Ein weiterer Vorteil ist eine deutliche Reduzierung der benötigten Probenmenge.⁶³ Durch die Probenvorbereitung, bei welcher das Molekül sehr schnell auf -150 °C abgekühlt wird, werden sie in ihrem gelösten Zustand fixiert. Dies repräsentiert die physiologischen Bedingungen besser als die kristalline Konformation des Zielmoleküls.^{63,64} Auch ist eine zeitaufgelöste Methode der cryo-EM entwickelt worden, bei welcher die Reaktanten automatisch vermischt und vitrifiziert (Eis bleibt amorph; keine Kristallbildung) werden. So können kurzlebige Zustände im Millisekundenbereich untersucht werden.^{65,66} Die Zeitauflösung ist hierbei maßgeblich durch die Qualität der Durchmischung der Probe gegeben. Eine kurze Mischdauer führt zu einer nicht ausreichenden Homogenität der Probe und somit zu einem qualitativ schlechteren Datensatz.⁶⁷

Eine weitere wichtige Methode zur Untersuchung von Struktur und Dynamik von Biomakromolekülen basiert auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Anders als bei NMR herrscht hier keine Größenbeschränkung, so dass auch große Moleküle bspw. in Zellen untersucht werden können.^{68,69} Dafür muss einer von zwei Fluoreszenzlabeln, deren Emission- und Absorptionsspektrum einander überlappen müssen, angeregt werden und sich in räumlicher Nähe zwischen 15 und 90 Å⁷⁰ zum zweiten Label befinden.

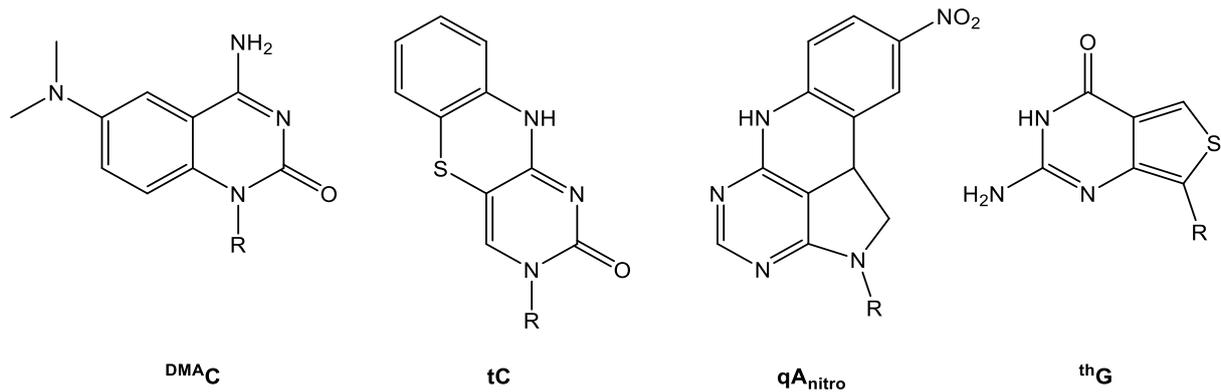


Abbildung 8: Auswahl fluoreszenter Nucleobasen, die beim base–base FRET eingesetzt werden.⁷¹

Im Rahmen von FRET wird nun strahlungslos die Energie vom angeregten Fluorophor (Donor) auf den Akzeptor übertragen und Licht emittiert. Als Fluorophore werden meist Cy-, Alexa- oder ATTO-Farbstoffe verwendet.⁷² Diese werden jedoch meist über flexible Linker an dem Zielmolekül befestigt, was die Messgenauigkeit minimiert und einen wichtigen Informationsträger, die relative Orientierung der Fluorophore zueinander, unbrauchbar macht.⁷¹ Dieses Problem ließ sich durch den Einsatz fluoreszenter Nucleobasen beheben.^{73,74} Durch die starre Anordnung im Basenstapel können so präzise Informationen aus der Orientierung gewonnen werden. Eine Auswahl fluoreszenter Nucleobasen ist in Abbildung 8 gezeigt.

Abschließend sei noch die EPR-Spektroskopie erwähnt, auf die im kommenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.4 EPR–Spektroskopie

Die EPR–Spektroskopie ermöglicht ebenfalls die Erforschung von Strukturen und Dynamiken von Biomakromolekülen. Anders als bei der NMR–Spektroskopie gibt es bei dieser Methode wegen der viel kleineren Anzahl an zu untersuchenden Spins keine Größenlimitierung der möglichen Zielobjekte. Auch ist keine Nah– und Fernordnung der Moleküle vgl. Röntgenstrukturanalyse nötig, um Informationen bezüglich Konformationsgleichgewichte und deren Änderungen^{75,76} oder Zugänglichkeit von bestimmten Regionen⁷⁷ zu gewinnen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass das zu untersuchende Molekül ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthält. Dies geschieht meist durch das Einführen von paramagnetischen Metallionen oder organischen Radikalen, da Nukleinsäuren und die meisten Proteine diamagnetisch sind. Standardmäßig beginnen EPR–Untersuchungen mit einer cw–Messung, weshalb auch dieses Kapitel mit ihr beginnt.

1.4.1 cw–EPR–Spektroskopie

Die hier präsentierte Einführung in die cw–EPR–Spektroskopie beruht auf verschiedenen Publikationen und wird anhand eines Nitroxidradikals beschrieben.^{78–83}

Der Spinzustand eines Elektrons wird durch die zwei Kennzahlen der Spinquantenzahl s ($s = \frac{1}{2}$ für ein Elektron) und der magnetischen Quantenzahl m_s charakterisiert ($m_s = \pm \frac{1}{2}$ für ein Elektron), welche die Orientierung des Spins bezogen auf eine Achse beschreibt. In Abwesenheit eines magnetischen Felds sind die beiden Zustände entartet. Wird nun ein Magnetfeld B_0 angelegt richten sich die Spins parallel oder antiparallel an der Richtung (meist die z –Richtung) des Magnetfeldes aus. Diese Spinzustände sind nicht mehr energetisch entartet. Die Energie dieser beiden Zustände lässt sich wie folgt beschreiben:

$$E = m_s B_0 \mu_B g_e$$

Für den Grundzustand mit $m_s = -\frac{1}{2}$ und $m_s = +\frac{1}{2}$ für den angeregten Zustand ergeben sich folgende Ausdrücke:

$$E = -\frac{1}{2} B_0 \mu_B g_e \text{ (Grundzustand)}$$

$$E = +\frac{1}{2} B_0 \mu_B g_e \text{ (angeregter Zustand)}$$

Mit B_0 für das Magnetfeld, μ_B für das Bohrsche Magneton und g_e als g –Faktor des freien Elektrons.

Die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zuständen entspricht demnach:

$$\Delta E = B_0 \mu_B g_e$$

Der Resonator dient der Zuführung, Ausrichtung und Verstärkung des Mikrowellenfeldes zur Probe. Wenn das Magnetfeld eine Zeeman-Aufspaltung erzeugt, die der Mikrowellenfrequenz entspricht, bewirkt der magnetische Teil der Mikrowellenstrahlung im Resonator ein Umklappen des Spins im Magnetfeld. Da der Effekt des Spin-Flips allein nicht ausreicht, um die Resonanz nachzuweisen, bedient man sich in der cw-EPR einer Magnetfeldmodulation. Durch die Modulation wird die ‚Resonanz‘ zeitlich mit einer bestimmten Frequenz (Modulationsfrequenz) ein und ausgeschaltet und so erreicht, dass nicht ein wenig empfindliches statisches Signal detektiert werden muss, sondern ein

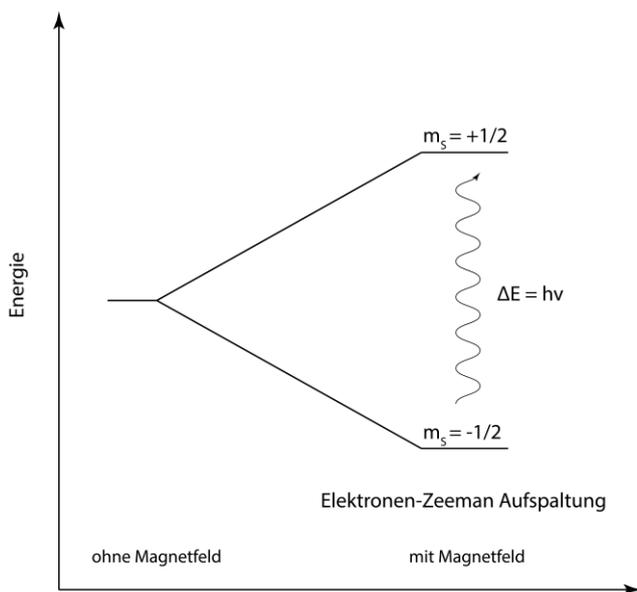


Abbildung 9: Schematische Darstellung der energetischen Zustände mit und ohne ein angelegtes Magnetfeld.

alternierendes Signal bei einer bestimmten Frequenz detektiert wird (Lockin-Effekt). Daraus folgt auch, dass das cw-EPR-Signal als Ableitung einer Absorption detektiert wird. Die Resonanzbedingung ist erfüllt, wenn:

$$\Delta E = B_0 \mu_B g_e = h\nu$$

Mit h für das Plancksche Wirkungsquantum und ν für die verwendete Mikrowellenfrequenz. Die Position der Absorption im cw-Spektrum ist wiederum durch den g -Faktor charakterisiert und ist unabhängig vom Magnetfeld und der verwendeten Frequenz. Für ein freies Elektron ist $g_e = 2.0023$. Über Abweichungen von diesem

Wert lassen sich so Aussagen über Bindungssituation, Orientierung oder elektronische Konfiguration treffen. Verursacht werden diese Abweichungen durch Kopplung zwischen Spin- und Bahndrehmoment sowie zwischen dem magnetischen Moment des beobachteten Elektronenspins und anderen Elektronen- bzw. Kernspins in der Probe. Die Resonanzbedingung ist für alle Radikale gültig, es muss lediglich g_e gegen den g -Faktor des entsprechenden Radikals getauscht werden.

Neben der EZ-Aufspaltung tritt auch die Kern-Zeeman-Aufspaltung (NZ) auf. Die NZ-Aufspaltung spielt vor allem für die NMR-Spektroskopie eine entscheidende Rolle. Nichtsdestotrotz ist sie auch in der EPR von Bedeutung, obwohl die NZ-Aufspaltung um den Faktor 658 geringer ist. Wie auch beim Elektron kann der Kernspin in Abhängigkeit seiner Kernspinquantenzahl I nur eine bestimmte Anzahl an Orientierungen einnehmen. $2I + 1$ beschreibt die Zahl der möglichen Orientierungen. Jeder dieser Orientierungen ist eine Kernspinquantenzahl m_I zugeordnet. Betrachtet man Nitroxidradikale, welche

zu den geläufigsten Spinlabel zählen, so liegt die Spindichte zu 60% auf dem Sauerstoff ($I(^{16}O) = 0$) und zu 40% auf dem Stickstoff ($I(^{14}N) = 1$). Eine Interaktion zwischen dem Elektronenspin und dem Kernspin findet jedoch nur mit dem Stickstoffkern statt, da für eine Kopplung $I > 0$ sein muss. Diese Kopplung resultiert in einer zusätzlichen Aufspaltung der zu beobachteten Resonanzlinien gemäß den erlaubten Übergängen und wird Hyperfeinaufspaltung genannt. Für die Übergänge müssen die Auswahlregeln $\Delta m_s = \pm 1$ und $\Delta m_l = 0$ erfüllt sein. Für ein Nitroxidradikal resultiert dies in drei EPR-Linien (siehe Abbildung 10). Neben dem g-Faktor und der Hyperfeinaufspaltung ist auch die EPR-Linienform ein wichtiger Informationsträger, da diese die Dynamik des beobachteten Systems widerspiegelt. Induziert wird dies dadurch, dass viele Eigenschaften, darunter auch der g-Wert und die Hyperfeinaufspaltung A , anisotrop sind. Die Dynamik des Spinlabels lässt sich über die Rotationskorrelationszeit τ_c beschreiben, wenn eine isotrope Brownsche Bewegung des Spinlabels angenommen wird.

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3k_B T}$$

Mit k_B für die Boltzmann-Konstante, T für die Temperatur, η für die Viskosität des Mediums und r für den hydrodynamischen Radius des Moleküls. Bei sehr kleinen Rotationskorrelationszeiten ($\tau_c \approx 10$ ps) geschieht die Neuorientierung des Moleküls im Bezug auf das Magnetfeld sehr schnell und die anisotropen Anteile mitteln sich aus. In diesem Fall werden drei schmale Linien mit gleicher Intensität beobachtet (siehe Abbildung 10).

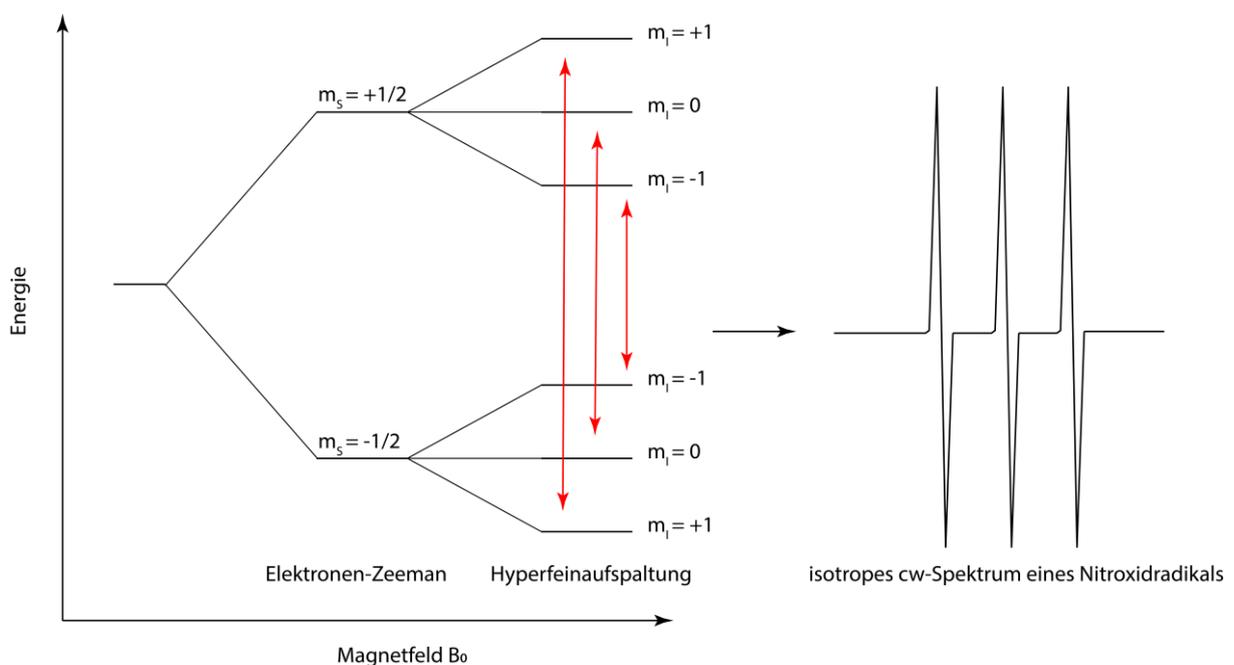


Abbildung 10: Links: Energieschema eines Nitroxids mit Elektronenspin $s = \frac{1}{2}$ und $I = 1$ bei einem angelegten Magnetfeld B_0 . Die roten Pfeile symbolisieren die nach den Auswahlregeln erlaubten Übergänge. Rechts: cw-Spektrum eines Nitroxidradikals für das gezeigte Energieschema.

Im Gegensatz hierzu stellen sich bei sehr langsamen Dynamiken, wo die Rotationskorrelationszeit im Bereich von Mikrosekunden liegt, als breites festkörperähnliches Spektrum dar. Die Bewegungen des Spinlabels können aus solchen Spektren nicht mehr aufgelöst werden, sie werden maßgeblich durch die Rotationskorrelationszeiten des restlichen Moleküls geprägt.

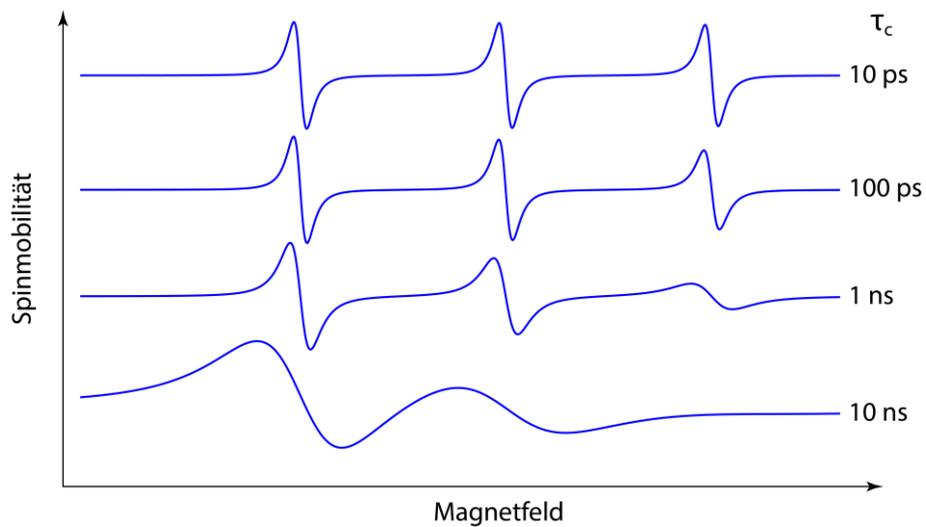


Abbildung 11: Simulierte cw-Spektren im X-Band (10 GHz) zur Veranschaulichung der Dynamik von Nitroxidspinlabel. Die Spektren wurden mittels EasySpin erstellt. Folgende Parameter wurden für A und g verwendet: $g = 2.003, 2.006, 2.009$; $A = 5.8 \text{ MHz}, 5.8 \text{ MHz}, 30.8 \text{ MHz}$.

Langsamere oder schnellere Dynamiken als die betrachteten Grenzfälle schlagen sich nicht in einer Änderung des cw-Spektrums nieder. Betrachtet man jedoch den dynamischen Bereich zwischen den beiden Extremfällen, also Fälle, bei welchen sich eine Änderung von τ_c direkt auf die Linienform auswirkt, können eben aus diesem direkten Zusammenhang Informationen gewonnen werden. Für die Abhängigkeit des cw-Spektrums von τ_c sind in Abbildung 11 verschiedene simulierte Spektren abgebildet, die sich in der Rotationskorrelationszeit unterscheiden.

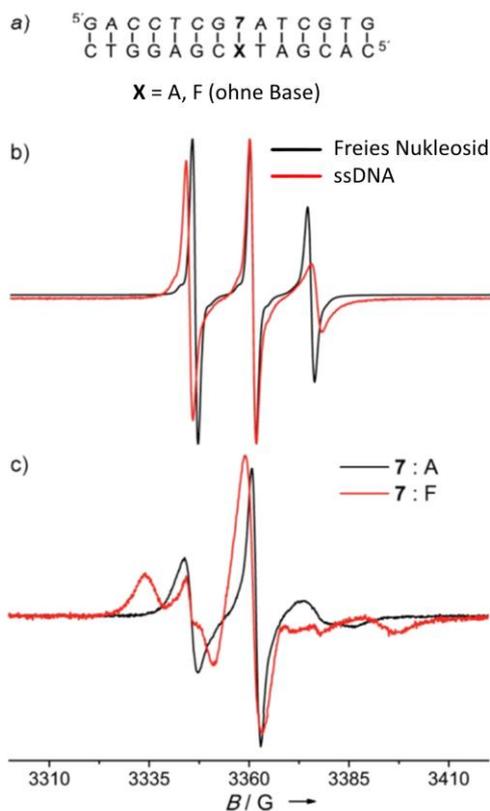


Abbildung 12: EPR-Spektren eines spinmarkierten Nucleosids, einer ssDNA und eines DNA-Duplexes, in welchem das spinmarkierte Nucleosid einmal einem A und einmal einem Pentosering gegenüber liegt. **a:** Sequenz des markierten Duplexes, wobei die 7 für den modifizierten Baustein steht. **b:** EPR-Spektrum des freien Nucleosids (schwarz) und der markierten ssDNA (rot). Das Nucleosid wurde aufgrund seiner schlechten Löslichkeit bei 30 °C in DMSO vermessen. **c:** EPR-Spektren der DNA-Duplexe, wobei einmal ein Adenosin (schwarz) und einmal eine Pentose (rot) der markierten Position gegenüber liegt. Die Grafik wurde aus [85] entnommen und angepasst.

Spektrums. Auf diese Weise können natürlich vorkommende Positionen, an welchen die Nucleobase fehlt, ausgemacht werden, wie sie bei spontanen hydrolytischen Spaltungen der N-Glykosid-Bindung oder bei den Reparaturen von DNA mittels DNA-Glykolase entstehen.^{85,86} Nicht nur die Interaktion von zwei Partnern kann mittels cw-EPR verfolgt werden, es ist ebenfalls möglich durch die Markierung verschiedener Positionen in einer Nucleinsäure bzw. eines Proteins diese auf strukturierte Bereiche hin zu untersuchen.

So kann durch die Messung von cw-Spektren beispielsweise die Hybridisierung zweier Oligonucleotide nachgewiesen werden, da dies zu einer deutlichen Reduktion der Mobilität des Spinlabels führt. Exemplarisch an einer von Jakobsen *et al.* publizierten Arbeit zu sehen.⁸⁴ Wie zu erwarten, führt der Einbau des Nucleosids zu einer Linienverbreiterung des aufgenommenen EPR-Spektrums im Vergleich zum freien Nucleosid (siehe Abbildung 12b). Dies ist auf eine Verringerung der Bewegungsfreiheit des Labels zurückzuführen. Die Linienverbreiterung nimmt zu, sobald der komplementäre Gegenstrang zugegeben worden ist. Steht die spinlabelte Base im Doppelstrang einem A gegenüber, hat der Spinlabel nicht ausreichend Platz im Strang und dreht sich nach außen. Durch die Einfachbindungen des Linke behält der Spinlabel, durch Rotation um eben jene, einen gewissen Grad an Mobilität. Wird die gegenüber liegende Base hingegen entfernt und der Spinlabel trifft nur auf das Zuckerrückgrat der DNA, kann der Spinlabel aufgrund seiner Planarität in den Basenstapel interkalieren und wird über π - π -Wechselwirkungen fixiert. Dies schränkt die Drehbarkeit um die Einfachbindungen ein und führt so zu einer deutlichen Verbreiterung des

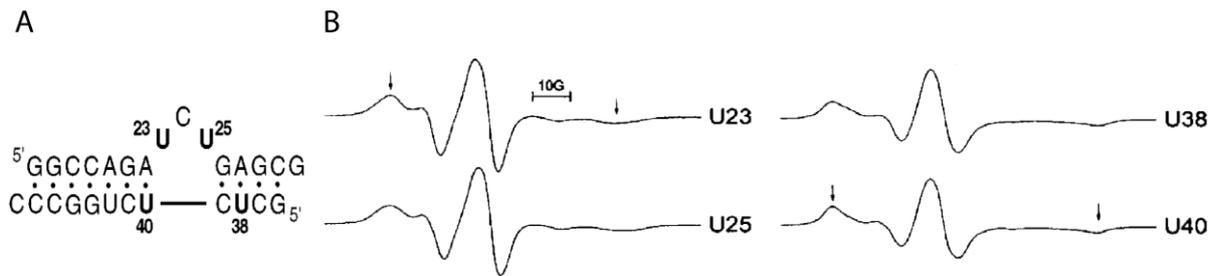


Abbildung 13: A: Sequenz der untersuchten TAR RNA. Die markierten Positionen U23, U25, U38 und U40 tragen die Spinlabel. B: EPR-Spektren der gelabelten TAR RNA. Die Pfeile identifizieren die Extrempunkte im Hoch- und Tieffeld. Die Abbildung wurde aus [88] übernommen.

Am Beispiel einer aus TAR stammenden RNA mit Stamm-Schleifen-Motiv konnten Edwards *et al.* anhand der gelabelten Position doppelsträngige von einzelsträngiger RNA unterscheiden (siehe Abbildung 13).⁸⁷ Die Autoren haben zu diesem Zweck vier unterschiedliche Proben dargestellt, welche an unterschiedlichen Positionen einen Spinlabel trugen (siehe Abbildung 13A). Die resultierenden EPR-Spektren zeigen deutlich eine erhöhte Mobilität der Positionen U23 und U25 im Vergleich zu U38 und U40 (siehe Abbildung 13B). Die in der Schleifenstruktur befindlichen Positionen verhalten sich eher wie einzelsträngige RNA.⁸⁷ Befindet sich mehr als ein Spinlabel in einem Molekül können Abstände zwischen diesen ermittelt werden. Die bestimmbare Distanz ist je nach verwendetem Spinlabel und zu untersuchendem System auf etwa 25 Å begrenzt.^{88–90} EPR-Methoden wie Pulsed Electron-Electron Double Resonance (PELDOR) bzw. Double Electron-Electron Resonance (DEER) ermöglichen jedoch Abstandsbestimmungen von 15 Å bis hin zu 100 Å^{91–93}, in Ausnahmefällen sind bereits 140 bis 160 Å^{94,95} erreicht worden.

1.4.2 PELDOR-Spektroskopie

Abstandsbestimmung in der EPR-Spektroskopie basiert auf der Dipol-Dipol-Kopplung zweier Spins. Problematisch hierbei ist jedoch, dass die Beiträge der Kopplung bei Nitroxidradikalen für Abstände ab 20 Å viel kleiner als die inhomogene Linienverbreiterung, welche durch die Anisotropie von g und A gegeben ist, ausfallen. Dies ist auch der Grund, warum die Abstandsbestimmung mittels cw-EPR limitiert ist. Aus diesem Grund muss die Dipol-Dipol-Kopplung vom Rest getrennt werden. Im Folgenden wird die Austauschkopplung vernachlässigt, da diese exponentiell abfällt und bereits ab einer Entfernung von 15 Å zwischen den beiden Spins vernachlässigbar klein geworden ist.⁷⁸ Zudem wird angenommen, dass die Quantisierungsachse der betrachteten Spins parallel zum angelegten Magnetfeld B_0 liegt (Hochfeldnäherung).⁸⁹ Die abstand- und orientierungsabhängige Dipol-Dipol-Kopplung ist unter Berücksichtigung der obigen Annahmen durch

$$\omega_{ee} = \omega_{dd}(1 - 3\cos^2(\theta))$$

gegeben. Mit θ als Winkel zwischen dem angelegten Magnetfeld und dem Vektor, welcher durch die beiden Spinlabel gebildet wird (siehe Abbildung 14A) und ω_{dd} als dipolare Kopplungskonstante, die sich aus folgender Formel ergibt

$$\omega_{dd} = \frac{\mu_B^2 g_A g_B \mu_0}{4\pi \hbar r_{AB}^3}$$

mit μ_B als Bohr'sches Magneton, μ_0 als magnetische Feldkonstante, \hbar als reduzierte Planck Konstante, r_{AB} als Abstand zwischen den beiden Spins sowie g_A und g_B als g-Wert der beiden Elektronen. Für Nitroxide kann der isotrope g-Wert von ≈ 2.006 angenommen werden (siehe Abbildung 14B).⁸⁹

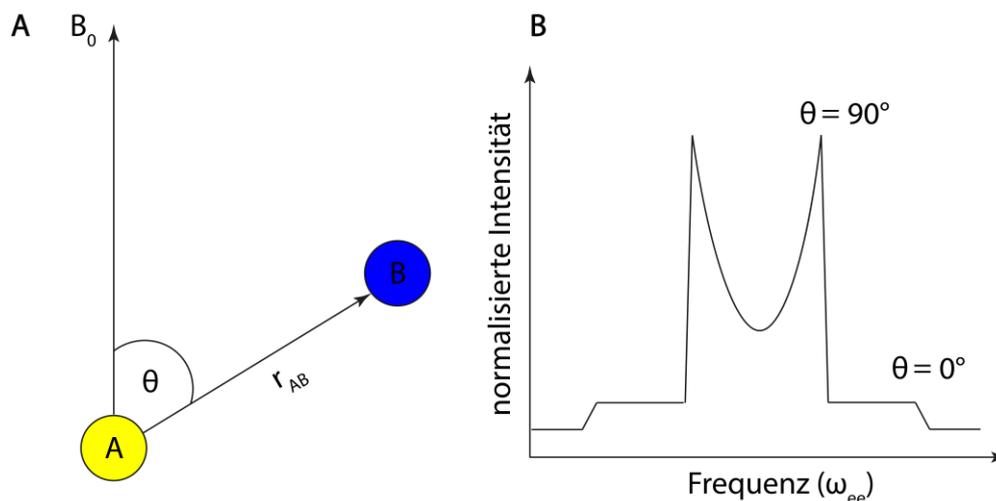


Abbildung 14: A: Schema der Dipol-Dipol-Kupplung zweier Spinlabel (A und B), welche vom Abstandsvektor r_{AB} und dem Winkel θ , der durch den Vektor des Magnetfelds B_0 und den Abstandsvektor r_{AB} gebildet wird, abhängt. B: Pake Pattern einer isotropen Orientierung des Abstandsvektors r_{AB} .

Bei senkrechter Ausrichtung des Abstandsvektors r_{AB} zum Magnetfeld kann der Abstand zwischen den Spins wie folgt beschrieben werden⁹⁶:

$$r_{AB} = \sqrt[3]{\frac{52.16}{\omega_{dd}(\theta = 90^\circ)}}$$

Standardmäßig erfolgt die Datenauswertung einer PELDOR-Messung über eine Tikhonov-Regulierung unter Verwendung von DeerAnalysis 2022⁹⁷.

PELDOR wurde zunächst als ein Drei-Puls-Experiment entwickelt⁹⁸ mit dem Nachteil, dass zwischen dem letzten eingestrahlenen Puls und dem ersten detektierbaren Signal ein Zeitfenster liegt, in welchem nicht gemessen werden kann (Totzeit). Dieses Problem wurde zu Beginn des Jahrtausends durch Martin *et al.*⁹⁹ und Pannier *et al.*¹⁰⁰ durch die Erweiterung der Pulssequenz behoben. Die entsprechende Sequenz ist in Abbildung 15 gezeigt.

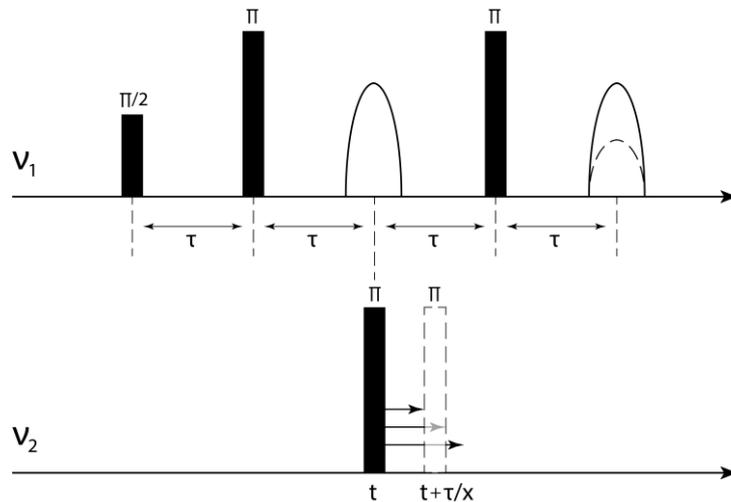


Abbildung 15: Pulssequenz eines Vier-Puls-PELDOR-Experiments.

Die PELDOR-Messung beginnt mit dem Einstrahlen eines $\pi/2$ -Pulses einer Frequenz ν_1 , welcher idealerweise nur die Orientierung der A-Spins um 90° hin zur $+y$ -Richtung ändert. In der anschließenden Evolutionszeit τ_1 beginnen die einzelnen Spins um die z -Achse zu präzedieren, dies geschieht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, sodass es zu einer Dephasierung in der xy -Ebene kommt. Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Spins kann unter anderem durch Inhomogenitäten im Magnetfeld oder anisotrope Wechselwirkungen, wie der Dipol-Dipol-Kopplung ω_{ee} zu Stande kommen. Je nach Orientierung des koppelnden Spins B wird $\frac{1}{2}\omega_{ee}$ entweder addiert oder subtrahiert.¹⁰¹ Nach der ersten Evolutionszeit τ_1 wird ein π -Puls eingestrahlt, welcher die A-Spins an der x -Achse spiegelt. Nach einer weiteren Evolutionszeit τ_2 kommt es zur Fokussierung der Magnetisierung in $-y$ -Richtung und man kann ein Hahn-Echo detektieren. (siehe in Abbildung 16 die Vektorgrafik mit den roten Pfeilen). Durch Einstrahlen eines weiteren π -Pulses einer Frequenz ν_2 (PELDOR-Pulses) zum Zeitpunkt t einer zweiten Frequenz sollen im Idealfall ausschließlich B-Spins invertiert werden. Dies führt zu einem Vorzeichenwechsel des Beitrags der Dipol-Dipol-Kopplung ω_{ee} zur Präzedierungsgeschwindigkeit der A-Spins. Fällt der Zeitpunkt t mit dem Hahn-Echo zusammen (siehe in Abbildung 16 die Vektorgrafik mit den blauen Pfeilen), erhält man nach einer Evolutionszeit τ_2 gefolgt von einem π -Puls, welchem wiederum eine Evolutionszeit τ_2 folgt eine Refokussierung des Echos in $+y$ -Richtung, dessen Intensität im Vergleich zum Hahn-Echo aufgrund von Relaxation abgenommen hat. Verschiebt man jedoch den Zeitpunkt des PELDOR-Pulses, resultiert der Vorzeichenwechsel der Dipol-Dipol-Kopplung darin, dass die A-Spins nach $2(\tau_1 + \tau_2)$ nicht mehr in $+y$ -Richtung refokussiert werden, sondern zu einem gewissen Grad aus der Phase laufen. (siehe in Abbildung 16 die Vektorgrafik mit den lilafarbenen Pfeilen). Der Grad der Dephasierung ist abhängig von der Dipol-Dipol-Kopplung und dem Zeitpunkt des PELDOR-Pulses und spiegelt den Beitrag der Kopplung zur Präzedierungsgeschwindigkeit wider.

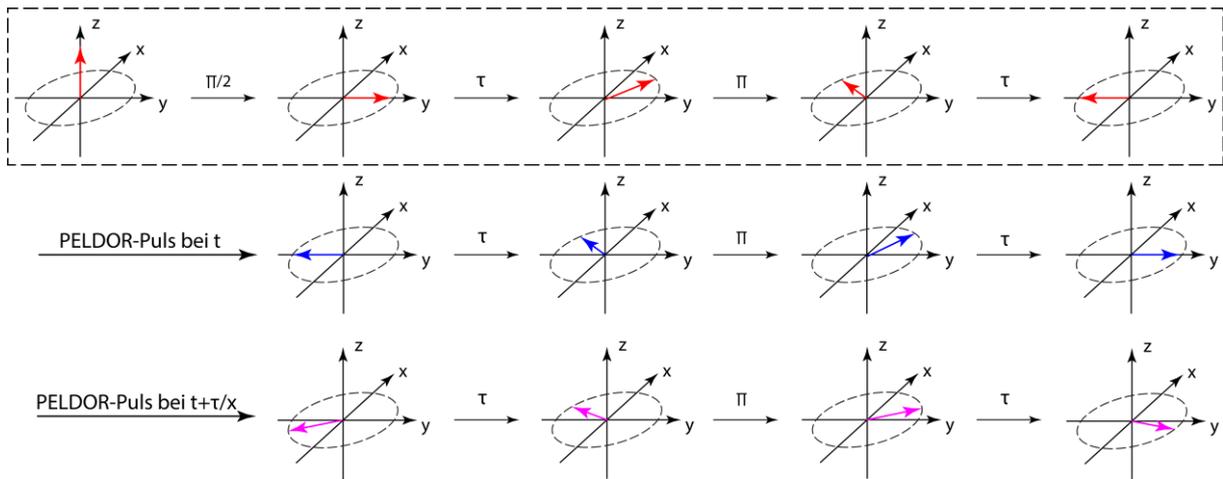


Abbildung 16: Vier-Puls-PELDOR Vektordiagramme mit $\omega_{ee} = +\frac{1}{2}$ und $\tau_1 = \tau_2$.

Die maximale Distanz, welche mittels PELDOR ermittelt werden kann, ist davon abhängig, wie schnell der durch Relaxation bedingte Zerfall des EPR-Signals ist. Je länger das Messfenster ist, desto größere Distanzen sind bestimmbar. Zwei Arten von Relaxation tragen zum Zerfall des Signals bei: die longitudinale Relaxation oder auch Spin-Gitter-Relaxation (T_1) und die transversale Relaxation bzw. Spin-Spin-Relaxation (T_2). Beide Prozesse setzen sofort mit dem Auslenken des Systems aus dem thermodynamischen Gleichgewicht ein.

Bei T_1 handelt es sich um die Relaxation der Population in Richtung Gleichgewicht gemäß Boltzmannverteilung. Hierbei gibt ein angeregter Spin spontan Energie an seine Umgebung ab und fällt auf ein tieferes Energieniveau bzw. nimmt Energie auf. Dies ist jedoch nur dann möglich, sofern die Umgebung die Energie, welche durch den Wechsel des Spins bereitstellt oder aufnehmen kann. Außerdem muss es eine Wechselwirkung zwischen Umgebung und Spinsystem geben, welche die Übertragung ermöglicht.⁸⁰ Zur Bestimmung von T_1 dient ein Drei-Puls-Experiment, bei welchem vor einem variablen Zeitraum t ein π -Puls eingestrahlt wird, welcher zu einer starken Störung des Gleichgewichts führt. Anschließend wird durch die Pulssequenz $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi - \tau$ ein Hahn-Echo erzeugt (vgl. die Vektrografik mit den roten Pfeilen in Abbildung 16). Die detektierte Echointensität verhält sich diametral zur verstrichenen Zeit. T_1 erlangt man durch das Fitten der Echointensität als Funktion der Zeit t . Die Relaxationsrate ist durch $\frac{1}{T_1}$ definiert und ist eine temperaturabhängige Größe. Sie bestimmt maßgeblich die Wiederholungsrate aufeinander folgender Experimente.

T_2 beschreibt die Relaxation in der zum Magnetfeld senkrecht stehenden xy -Ebene. Beim sogenannten Spin-Flip-Flop-Prozess führen Wechselwirkungen zwischen einem Spin im α -Zustand und einem Spin im β -Zustand dazu, dass sich deren Zustand invertiert. Hierbei findet anders als bei T_1 keine Änderung des Populationsgleichgewichts statt. Der Zustandswechsel führt jedoch zu einem Zerfall der Kohärenz und somit zu einer abnehmenden transversalen Magnetisierung.⁸⁰ Bestimmen lässt sich T_2 durch ein

Zwei-Puls-Experiment. Durch Auftragen der Echointensität, welches durch die Hahn-Echo-Sequenz erzeugt wird, gegen die Evolutionszeit (τ) erhält man, wenn ein exponentieller Zerfall angenommen wird, die phase memory time (T_m).¹⁰² Neben der Spin-Spin-Relaxation wird die T_m ebenfalls durch Kern-Spin-Wechselwirkungen beeinflusst. Analog zum Flip-Flop-Prozess bei Elektronenspins führt

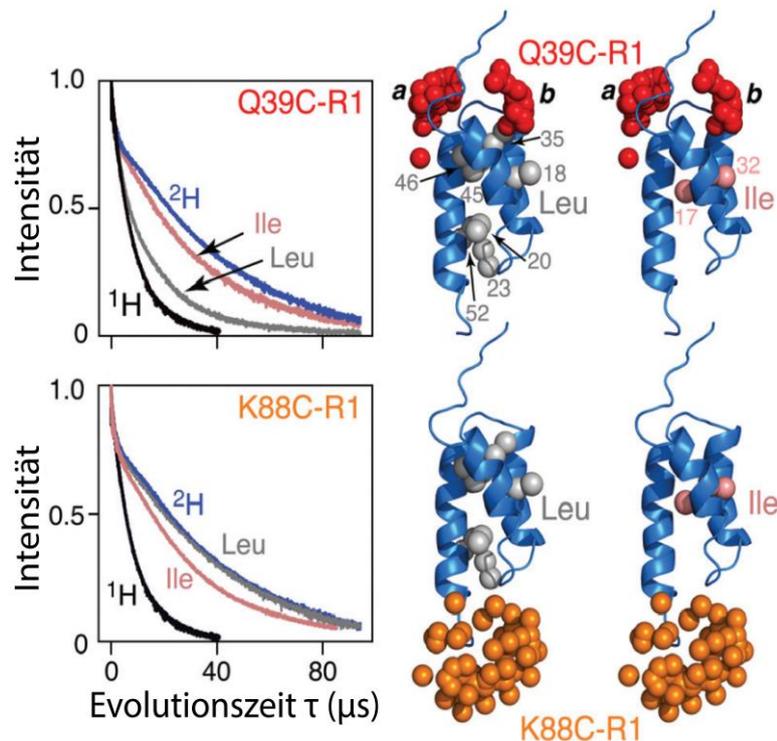


Abbildung 17: Die linken Felder zeigen die Spin-Echo-Kurven für vollständig deuterierte (blau), vollständig protonierte (schwarz) sowie Leu (grau) und Ile (rosa) methylprotonierte AviTag-Protein A-Proben mit perdeutერიerten Rückgrat. Die Nitroxidlabel befinden sich an Position Q39C (oben) und K88C (unten). Die rechten Felder zeigen die Strukturen des Proteins (blau) mit den Methylgruppen für Leu (grau) und Ile (rosa). Die berechneten Positionen des Sauerstoffatomensembles sind für Q39C in rot und für K88C in orange dargestellt. Die Abbildung wurde aus [107] übernommen und angepasst.

der Flip-Flop des Kernspins ($I_{\alpha+}I_{\beta-} \leftrightarrow I_{\alpha-}I_{\beta+}$) zu einer Änderung der Elektron-Kern-Dipolarenkopplung, welches in einer Dephasierung der Magnetisierung und zu einem Zerfall der Echointensität führt.^{103,104} Die Stärke des Einflusses auf die Phase ist von der Art des Kerns bzw. von dessen magnetischen Moment abhängig. So wirkt sich ein Deuteriumkern weniger stark auf T_m aus als ein Wasserstoffkern. Dies beruht auf dem kleineren magnetischen Moment des Deuteriums.¹⁰⁴ So ermöglicht die Messung in deuterierten Lösungsmitteln eine erhöhte T_m für die Positionen, welche nicht im besonderen Maße sterisch belastet sind und folglich für das Lösungsmittel nicht zu erreichen sind.¹⁰⁵ Für diese Fälle wäre es notwendig sowohl das Makromolekül als auch den Label selbst zu deuterieren. Eine Arbeit von Schmidt und Clore¹⁰⁶ zeigt wie groß der Einfluss einzelner Methylgruppen in einem sonst perdeutერიerten Protein sein kann. Dafür wurde das AviTag Protein A einmal an Position Q39C in der Nähe des N-Terminus und einmal in Position K88C in der Nähe des C-Terminus markiert. Anschließend wurde anhand von Zerfallskurven T_m bestimmt. Untersucht wurden vier unterschiedliche Fälle in deuterierten Lösungsmitteln: vollständig deuteriert, vollständig protoniert und Varianten bei welchen alle Leucine bzw. Isoleucine „protonierte“ Methylgruppen haben und das Rückgrat vollständig deuteriert vorliegt. Für das vollständig protonierte bzw. vollständig deuterierte Konstrukt ergaben sich so T_m von ungefähr 9 μs und 35 μs . Im Falle von Q39C bedingt das Einführen protonen-haltigen Leucins eine Halbierung von T_m auf etwa 17 μs . Wohingegen für K88C kein Effekt zu beobachten war. Die Verringerung von T_m durch Inkorporation des modifizierten Isoleucins ist laut

Autoren auf einen geringen Restwassergehalt zurückzuführen. Die räumliche Nähe der ^1H -Methylgruppe zum Spinlabel ist daher für den beschleunigten Zerfall der Kohärenz ausschlaggebend. Als kritisch haben sich hierbei Protonen, insbesondere Methylgruppen, erwiesen, die sich in einer Entfernung von 4 – 8 Å zum ungepaarten Elektron des Nitroxids befinden.^{107–111} Genau wie T_1 ist auch T_m eine temperaturabhängige Größe, sodass typischerweise PELDOR-Experimente bei kryogenen Temperaturen (50 K) durchgeführt werden müssen. Dennoch gibt es Beispiele, die zeigen, dass Raumtemperaturmessungen möglich sind. Hierfür müssen grundsätzlich zwei Probleme gelöst werden. Das erste Problem stellt die Rotation des Moleküls dar, diese sorgt dafür, dass die dipolare Kopplung ausgemittelt wird. Die Einschränkung der Bewegung kann beispielsweise durch Immobilisierung an ein Harz geschehen. Das zweite Problem ist, dass die transversale Relaxation T_2 des Spinlabel lang genug sein muss, um ein ausreichend langes Zeitfenster für die Evolution der dipolaren Kopplung zu ermöglichen. Eine Arbeit aus 2018 von Gränz, Erlenbach *et al.* demonstriert anhand einer doppelsträngigen DNA, welche über ihr negativ geladenes Rückgrat an eine positiv geladene Oberfläche gebunden wurde, dass im Zusammenspiel mit einem rigiden Spinlabel eine ausreichend hohe Mobilitätseinschränkung sowie eine hinlänglich lange Messzeit ermöglicht wird, um bei Raumtemperatur PELDOR-Experimente durchzuführen (siehe Abbildung 18).¹¹²

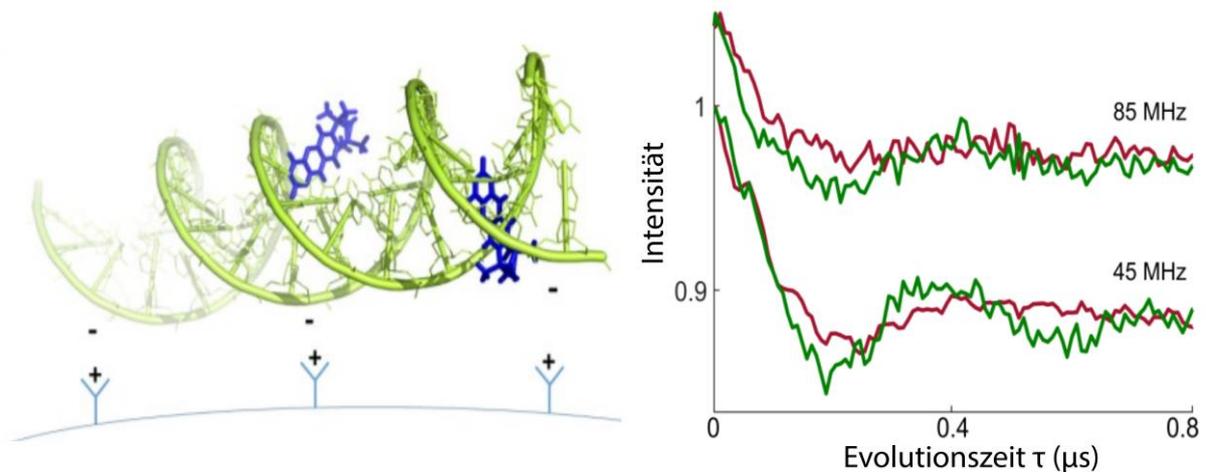


Abbildung 18: Links: Struktur des an Nucleosil gebundenen DNA-Duplex. Rechts: Time trace der PELDOR-Messung bei verschiedenen Frequenzoffsets. Die Messung bei Raumtemperatur (295 K) ist in Grün und die Tieftemperaturmessung (50 K) in Rot dargestellt. Die Abbildung wurde aus [113] adaptiert.

Das Deuterierungsexperiment zeigt deutlich, dass Methylgruppen in räumlicher Nähe zum ungepaarten Elektron zu einem stark verkürzten Messfenster führen. Die am häufigsten verwendeten Spinlabel sind Nitroxidlabel, welche meist geminale Methylgruppen in α -Position tragen, um das Nitroxid sterisch abzuschirmen. Diese Variante ist einfach herzustellen und ist kommerziell erhältlich. Für Messtemperaturen über 80 K beginnt die zunehmend stärker werdende Rotation der Methylgruppen die Messfenster jedoch drastisch zu verkürzen. Dies bedingt ein Temperaturlimit von etwa 80 K für methylhaltige Nitroxide bei Abstandsbestimmungen.^{113,114} Substituiert man die

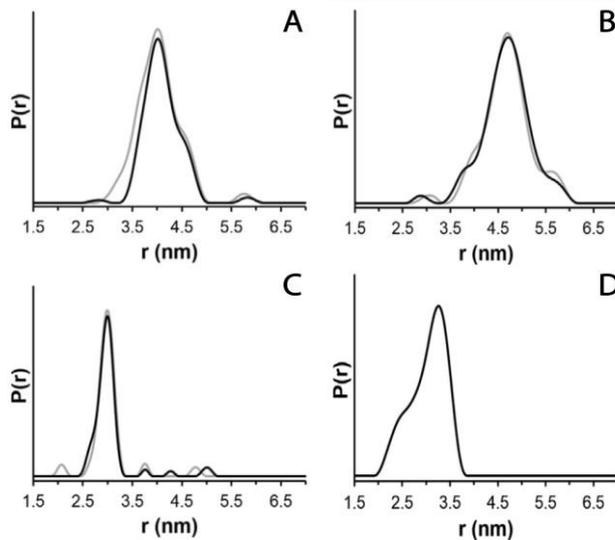


Abbildung 19: Abstandsverteilungen bei 80 K (schwarz) und 160 K (grau) für die Spinlabelpositionen 61/135 (A), 65/135 (B) und 65/80 (C) sowie die Abstandsverteilung für 65/80 (D) bei 295 K. A, B und C wurden in 24% Glycerol und D in Trehalose gemessen. Die Abbildung wurde aus [116] adaptiert.

Methylgruppen jedoch mit Spirohexylresten führt dies zu einer deutlich gesteigerten phase memory time. Jedoch muss auch in diesem Fall durch Matrixbildner das Zielmolekül immobilisiert werden. Gezeigt haben dies Meyer, Swanson *et al.* anhand von T4 Lysozym (T4L).¹¹⁵ Das Protein wurde in drei unterschiedlichen Varianten mit einem Cyclohexylnitroxid markiert und bei unterschiedlichen Temperaturen vermessen (siehe Abbildung 19). Die erhaltene Abstandsverteilung für die Paare 61/135 (A), 65/135 (B) und 65/80 (C) zeigen keine Temperaturabhängigkeit zwischen 80 K

(schwarz) und 160 K (grau), was auf den geringen Einfluss der Temperatur auf T_m in diesem Bereich zurückzuführen ist. Die Raumtemperaturmessung (D) stimmt hinsichtlich der vorhanden Rotamerspezies mit der Tieftemperaturmessung (C) überein, hat jedoch eine abweichende Gewichtung der Rotationsisomeren. Laut Autoren könnte die unterschiedliche Probenvorbereitung zu einem abweichenden Ensemble von Spinlabelkonformationen und so zu einer variierenden Abstandsverteilung führen.

1.5 Spinlabel für Nukleinsäuren und Proteine

Das vorherige Kapitel wurde unter anderem damit eingeleitet, dass die meisten Moleküle von Natur aus nicht für EPR-Studien geeignet seien, da ihnen die sogenannten Spinlabel fehlen. Durch das Einführen von Molekülen mit Radikalcharakter gelingt es Proben herzustellen, die für die EPR-Spektroskopie zugänglich sind. In diesem Kapitel sollen die drei verschiedenen Spinlabelklassen betrachtet werden, die für EPR-Studien eingesetzt werden, wobei der Fokus wieder auf dem Nitroxid liegt und Metallionen sowie Triarylmethylradikale hier nur angerissen werden.

1.5.1 Metallionen als Spinlabel für EPR

Als erste Klasse von Spinlabel wären die Metallionen zu nennen, wie Gd(III)^{116–118} und Cu(II)^{119,120} aber auch Mn(II)^{121,122}, Fe(III)¹²³ oder Co(II)^{124,125} werden in EPR-Messungen verwendet. Im Folgenden wird aufgrund deren Popularität auf den Gd(III)- und Cu(II)-Kern eingegangen.

Gd(III). Gd(III) wurde erstmals 2007 für die Abstandsmessung mittels PELDOR eingesetzt und avancierte wegen seiner zahlreichen Vorteile zu dem gebräuchlichsten Metallion bei PDS-Anwendungen.¹¹⁸ Aus sieben ungepaarten Elektronen resultiert eine Spinquantenzahl $S = \frac{7}{2}$. Im Vergleich zu $S = \frac{1}{2}$ mündet dies in einer gesteigerten Fernwirkung der dipolaren Kopplung. In Kombination mit einem scharfen Peak aus dem $-\frac{1}{2} \rightarrow +\frac{1}{2}$ Übergang, der bei zunehmender Feldstärke noch an Linienbreite verliert, da diese mit $\frac{1}{B_0}$ skaliert, führt zu einer gesteigerten Sensitivität bei Hochfeldmessungen.¹¹⁷ Bei Gd(III)-Gd(III)-Labeling sind so Abstände von ~ 3.8 nm in cw-Messungen zu erreichen, was in etwa einer Verdopplung gleichkommt, wenn man diese mit Abständen vergleicht, die durch Nitroxide zu erzielen sind.¹²⁶ Auch der T_m -Wert für Gd(III) ist bei seinem zentralen Übergang mit der von Nitroxiden vergleichbar bei gleichzeitig kürzerer T_1 -Relaxation, was den zeitlichen Abstand der aufeinander folgenden Experimente deutlich verringert.¹²⁷ Gleichzeitig ist Gd(III) in reduzierenden Medien stabil, wo organische Radikale meist recht schnell zu ihren inaktiven Spezies abgebaut werden, was es für in-cell-Experimente prädestiniert.^{128–130} Die meisten Gd(III)-basierten Label werden in Proteine und Peptide eingesetzt und für diese entwickelt. Es gibt aber auch Beispiele für Nukleinsäuren¹³¹ und die Funktionsprinzipien der Label unterscheiden sich nicht. Der Einbau von Metallionen basiert darauf, dass durch Chelatisierung der Ionen ein stabiler Komplex gebildet wird. Die Affinität des Chelats zum Metallion muss ausgesprochen hoch sein, da dissoziierte Metallionen zu Hintergrundsignalen führen.¹¹⁷ Diese Chelatkomplexe sind raumerfüllend und können oft flexibel und langkettig sein. Dies kann wiederum dazu führen, dass das Zielmolekül seinen nativen Faltungszustand

nicht einnehmen kann oder man eine relativ breite Abstandsverteilung erhält. Einige Beispiele für Chelatliganden sind in Abbildung 20 gezeigt.

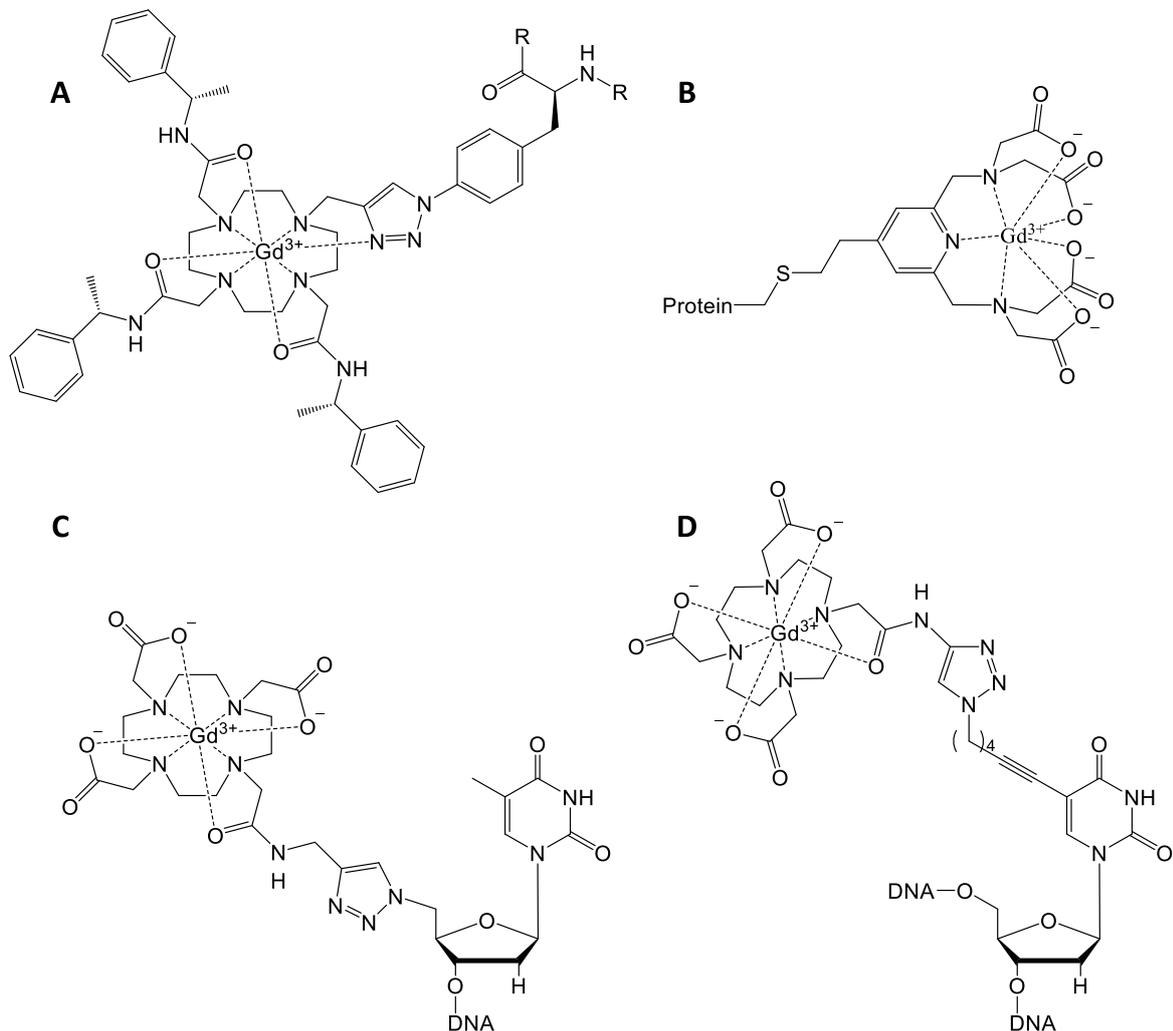


Abbildung 20: Chelatkomplexe die zur Abstandsmessung mittels Gd(III)-Ionen verwendet wurden. **A:** Ein auf Tetraxetan basierender Chelatbildner, welcher über Click-Chemie an 4-Azidophenylalanin gekuppelt wurde.¹³² **B:** Ein auf 4-Vinyl(pyridin-2,6-diyl)bismethylennitrilo-tetraessigsäure basierender Chelatbildner, welcher über seine Vinylfunktion mit einem Cystein des Proteins verknüpft wurde.¹²⁹ **C** und **D** zeigen die entsprechende terminale bzw. interne Varianten, welche für das Labeling von Nukleinsäuren eingesetzt wurden, ebenfalls auf Basis von Tetraxetan.¹³¹

Cu(II). Cu(II) war unter den ersten Metallionen, die für PDS benutzt wurden und wird bis heute in einer Vielzahl von Studien verwendet, worunter auch in-cell Experimente sind.^{127,133,134} Kupfer weist jedoch einige Nachteile gegenüber Gadolinium auf. So besitzt Cu(II), wie die meisten Metalle, eine große spektrale Breite, die die Anregungsbandbreite übersteigt. Dies führt dazu, dass in einem einzelnen PELDOR-Experiment nicht alle Spins auf einmal angeregt werden können. Eine Orientierungsselektion in den aufgenommenen Spektren kann daher nicht vermieden werden, was mehrere Messungen bei unterschiedlichen Frequenzen erfordert und bei der Datenanalyse berücksichtigt werden muss.¹²⁷ Weiterhin weist Cu(II) in Lösung eine relativ lange T_m von 4.7 μ s auf (X-Band)¹³⁵, welche sich jedoch nach dem Labeling deutlich reduziert und in der Regel kürzer als die von organischen Radikalen ist. Oft

werden daher Metallionen in Kombination mit organischen Radikalen beispielsweise Nitroxiden eingesetzt, was zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis, einer erhöhten Reichweite oder einer verbesserten Modulationstiefe führen kann.^{123,127,136,137} Die Anforderungen an die Chelatbildner bleiben zu denen von Gd(III) identisch. Im Regelfall adressiert man beim Labeling von Proteinen ein Cystein, was in einem Selektivitätsproblem mündet, insofern besonders cysteinreiche Proteine untersucht werden.

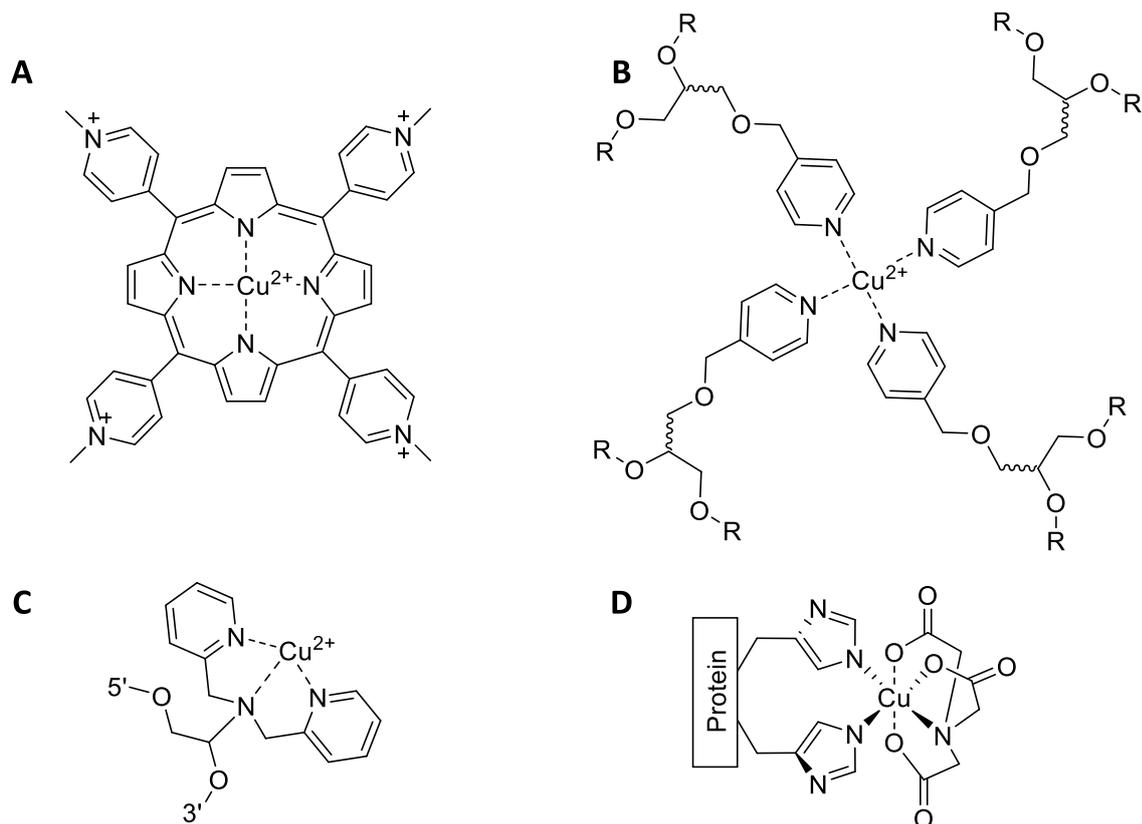


Abbildung 21: Chelatkomplexe die zur Abstandsbestimmung mit Cu(II)-Ionen verwendet wurden. **A:** Ein Porphyrinderivat (CuTMpyP4) zur Untersuchung von G-Quadruplexen.¹³⁸ **B:** Ein auf Pyridin basierender Ligand, der ebenfalls zur Untersuchung von G-Quadruplexen und Tetraden eingesetzt wird. Dieser spezielle Ligand muss sich nicht an den Enden einer Nucleinsäurekette befinden, sondern kann an jeder beliebigen Stelle der DNA eingebaut werden.¹³⁹ **C:** Chelatligand zur Untersuchung von DNA-Duplexen auf Basis von 2,2'-Dipicolylamin (DPA)¹⁴⁰. **D:** Schematische Darstellung des dHis-Cu(II)-NTA-Komplexes.

In diesen Fällen kann die Affinität des mit Iminodiessigsäure¹⁴¹ bzw. Nitrilotriessigsäure¹⁴² chelatisierten Cu(II) zu zwei aufeinander folgenden Histidinen (dHis), welche bedarfsweise durch Mutagenese einführbar sind, ausgenutzt werden (siehe Abbildung 21D). Anwendungsbeispiele für Cu(II) gibt es auch im Feld der Nucleinsäuren aber auf den Bereich von DNA begrenzt. Ein beliebtes DNA-Motiv, die mittels Kupfer untersucht werden sind G-Quadruplexe. Chelatliganden auf Basis von Porphyrinen erkennen diese und binden jeweils an den Enden der Tetrade und ermöglichen so Abstandsbestimmungen. Es sind auch keine Modifikationen der Zielstruktur notwendig, da das Porphyrinderivat nicht kovalent gebunden ist. (siehe Abbildung 21A)¹³⁸ Ebenfalls für Tetraden ist ein auf Pyridin basierender Ligand gedacht, welcher mit Cu(II) quadratisch-planare Komplexe bildet.

(siehe Abbildung 21B) Dieser Ligand wird an die DNA-Sequenz kovalent gebunden und kann auch mitten in der Sequenz liegen.^{139,143} Ein letztes Beispiel beruht auf dem 2,2'-Dipicolylamin (siehe Abbildung 21 D). Dieser Ligand wird an einer beliebigen Stelle in die Sequenz einer DNA eingebaut und erlaubt es im DNA-Duplex Abstände zu messen. Damit der Label den Duplex nicht stört, muss dieser einer abasischen Position gegenüber liegen.¹⁴⁰

1.5.2 Triarylmethylradikale als Spinlabel für EPR

Erstmals Mitte der 1990er entwickelt, sind Triarylmethylradikale (TAM) ursprünglich ein Werkzeug zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration im Gewebe, Setzten sich aber aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften im Bereich der EPR als Spinlabel durch.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Geringe Linienbreite (hohe Sensitivität)¹⁴⁷, hohe Relaxationszeiten (sowohl T_1 als auch T_2)^{148,149} auch bei physiologischen Temperaturen und eine hohe Persistenz¹⁵⁰ in oxidativen sowie reduktiven Medien sind die wichtigsten Eigenarten von Tritylradikalen. Durch TAM konnte erstmals an einem DNA-Duplex ein Abstand bei Raumtemperatur mittels PDS ermittelt werden.¹⁵¹ Zuvor war dies nur in gefrorenen Medien möglich aufgrund der geringen T_m . Die Größe der Tritylradikale beschränkt den Einsatz jedoch auf unstrukturierte Bereiche und Termini der Zielstrukturen, andernfalls würde möglicherweise keine oder eine nicht physiologische Struktur eingenommen werden. Diesen Nachteil teilt sich das TAM mit den Metallionen. Strukturell handelt es sich bei TAMs um kohlenstoffzentrierte Radikale. Das Radikal als Zentrum des Moleküls wird hierbei von drei Arylsubstituenten flankiert. Ein Aryl trägt meistens zwei Thioacetone oder Ähnliches, welche die Stabilität des Radikals gewährleisten sollen sowie in *para*-Position eine löslichkeitsvermittelnde Gruppe, über die der Label auch kovalent an die Zielstruktur gebunden werden kann. TAMs werden grundsätzlich postsynthetisch eingeführt. Meist nutzt man die Carbonsäurefunktion in aktivierter Form, beispielsweise als Säurechlorid¹⁵¹, um das TAM an die Zielstruktur zu koppeln. Alternativ dazu kann die Carbonsäure durch eine Alkinfunktionalität bzw. Azid ausgetauscht werden und das TAM mittels Click-Chemie¹⁵² angebracht werden oder ein Halogen, um über Kreuzkupplung¹⁵³ zum Ziel zu kommen. Proteine werden häufig über Disulfide, Thioether oder Triazole mit dem Tritylradikal gekuppelt. Thioether und Triazole ermöglichen auch den Einsatz von TAMs in *in-cell*-Experimenten.^{154,155} Abbildung 22 zeigt die zwei am weitest verbreiteten TAM-Derivate, Finland und OX063, mit unterschiedlichen Kupplungsmethoden.

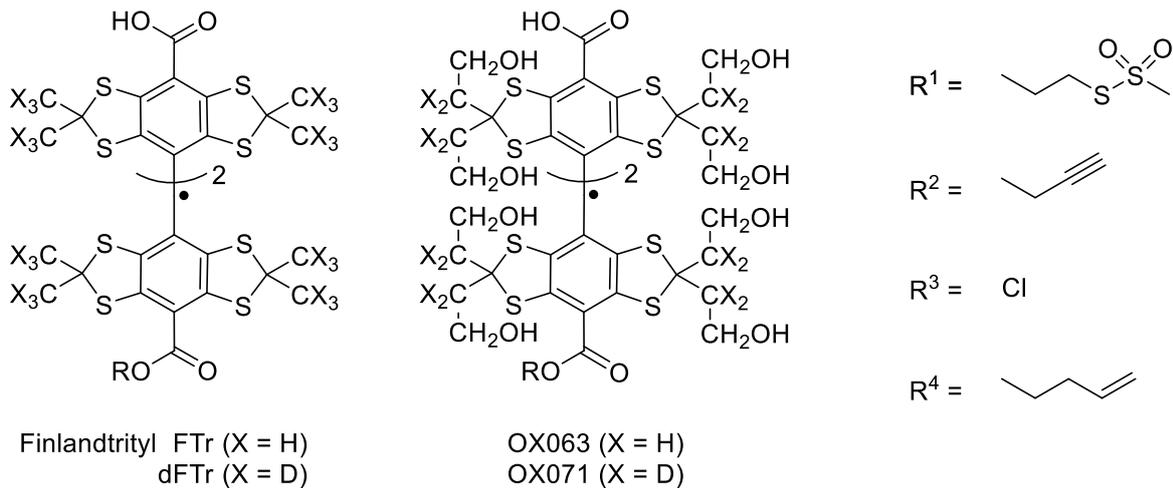


Abbildung 22: Strukturen des Finlandradikals (links) und des OX063 (rechts) in der protonierten und deuterierten Variante, welche mit verschiedenen Linkern (R^1 bis R^4) an ihren Partner gekuppelt werden können.

1.5.3 Nitroxidradikale als Spinlabel für EPR

Abschließend bilden die Nitroxide die letzte und gleichzeitig gebräuchlichste Klasse von Spinlabeln in der EPR. Trotz der Vorteile, die TAM und Metallionen den Nitroxiden voraushaben, wie hohe Persistenz oder lange Relaxationszeiten bei Raumtemperatur, besitzen Nitroxide ihre eigenen Qualitäten. Nitroxide bzw. deren Vorläufer sind in ihrer einfachsten Ausfertigung oft kommerziell erhältlich oder einfach zu synthetisieren, wobei dies auf komplexere Label nur bedingt zutrifft. Neben soliden spektroskopischen und chemischen Merkmalen besitzt das Nitroxid den Größenvorteil. Vergleicht man die Dimensionen von Nitroxiden mit Metallen oder TAMs, so bilden die Nitroxide die kleinsten und variabelsten Spinlabel. Auf verschiedensten Wegen modifizierbar und positionsunabhängig einsetzbar, können sie beispielweise kanonischen Nukleobasen ähneln oder ein Aminosäurederivat widerspiegeln, ohne die strukturelle Integrität der Sekundär- oder Tertiärstruktur zu stören. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit Design und Anwendung von auf Nitroxiden basierenden Spinlabeln und unterteilt sich in die Punkte: Strukturelle Merkmale, Linkerdesign, Einbau und Positionierung.

1.5.3.1 Strukturelle Merkmale von Nitroxidradikalen.

Die Stabilität von Nitroxiden gegenüber Reduktion zum Hydroxylamin ist von einer Reihe von Faktoren abhängig. Beginnend bei der Ringgröße, werden Nitroxide in Fünf- und Sechsringe unterteilt, wobei Fünfringe eine geringere Anfälligkeit gegenüber Oxidation und Reduktion aufweisen. Zusätzlich sind gesättigte Ringe günstiger als ihre ungesättigten Pendanten.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Alle Nitroxidradikale, welche in der EPR eingesetzt werden, sind an den Kohlenstoffen in α -Position vierfach gebunden. Andernfalls kommt es unter Bildung eines Nitrons und eines Hydroxylamins zu einer Disproportionierung zweier Radikale.^{159,160} Da sich Nitroxidradikale meist vom Tetramethylpiperidin ableiten, sind Methylgruppen

die am weitest verbreiteten Substituenten für die α -Kohlenstoffe. Gleichzeitig bildet die Methylgruppe die Minimallösung hinsichtlich Langlebigkeit in reduzierenden Umgebungen. Eine Halbwertszeit von zwei Minuten im Blutkreislauf limitiert das Anwendungsspektrum solcher auf Methylgruppen basierter Spinlabel auf nicht reduzierende Umgebungen.¹⁶¹ Bessere Resultate werden erzielt, wenn die Methylgruppen gegen Spirocyclohexylreste substituiert werden. Diese bieten im Vergleich zu Methylgruppen eine größere räumliche Ausdehnung, welche das Radikal besser vor Reagenzien abschirmen können. Aber durch die Tatsache, dass sie einen Zyklus bilden, sind sie konformationell eingeschränkt und bewegen sich abhängig voneinander. Der Einsatz von vier Ethylgruppen führt deswegen nochmals zu einer dramatischen Verbesserung der Abschirmung.^{158,162,163} Der Austausch der Methylgruppen bietet nicht nur den Vorteil erhöhter Stabilität des Radikals, zusätzlich führen Spirocyclohexyl- und/oder Ethylreste zu einer verbesserten T_m (siehe auch Abschnitt 1.4.2).^{115,164} In Abbildung 23 werden die Trends hinsichtlich Stabilität und T_m von Nitroxidradikalen grafisch veranschaulicht.¹⁶³

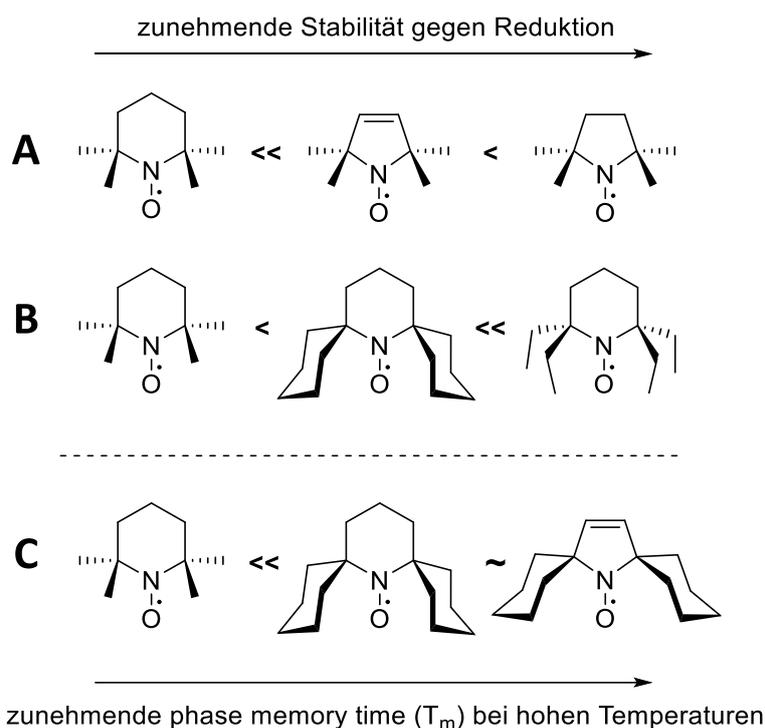


Abbildung 23: Einfluss der Größe und Struktur des Rings (A) und Art der Substituenten des α -Kohlenstoff (B) auf die Stabilität gegen Reduktion des Radikals zum Hydroxylamin. C beschreibt wie die Ringstruktur und die α -Substituenten die phase memory time (T_m) bei höheren Temperaturen beeinflussen. Die Grafik ist Quelle [162] entlehnt und angepasst.

1.5.3.2 Linkerdesign.

Über den Linker werden die Spinlabel mit der Zielstruktur verknüpft. Aber was macht einen Linker zu einem guten Linker? Grundsätzlich ist das Ziel eine möglichst genaue Abstandsverteilung aus den Daten eines Experiments zu gewinnen. Der optimale Fall wäre demnach ein immer gleichbleibender Abstand zwischen den betrachteten Radikalen über die gesamte Dauer des Experimentes hinweg. Wählt man also einen langen und flexiblen Linker, wird das Aussehen des EPR-Spektrums maßgeblich durch die Eigenbewegung des Labels geprägt und wird nur noch bedingt für Dynamiken zu gebrauchen sein.¹⁶⁵ Aus dieser Überlegung heraus werden Linker benötigt, die hinsichtlich ihrer Konformation wenig variabel sind, sprich wenige oder keine Rotationen um Einfachbindungen ermöglichen, um eine unabhängige Bewegung des Spinlabels zur Zielstruktur zu erschweren. Eine erste Gruppe von Linkern, die die Mobilität des Radikals einschränkt aber eine Rotation um Einfachbindungen nicht oder nur teilweise behindert, sind Label deren Konformation trotz Rotation eindeutig bleibt. Dies wird dadurch gewährleistet, dass die Rotationsachse und die Bindung zwischen Sauerstoff und Stickstoff auf einer Linie liegen. Ein erstes Beispiel stammt von Sajid, Jeschke *et al.*¹⁶⁶ für DNA. Abbildung 24 zeigt einige Beispiele für Label von Nukleotiden und Proteinen mit festgelegter Konformation. Die Varianten ^{lm}U und ^{lm}Um besitzen durch eine zusätzliche Wasserstoff-brückenbindung, zwischen dem Amin des Imidazols und der Carbonylverbindung in Position 4 der Nucleobase, die Möglichkeit die Rotation einzuschränken.

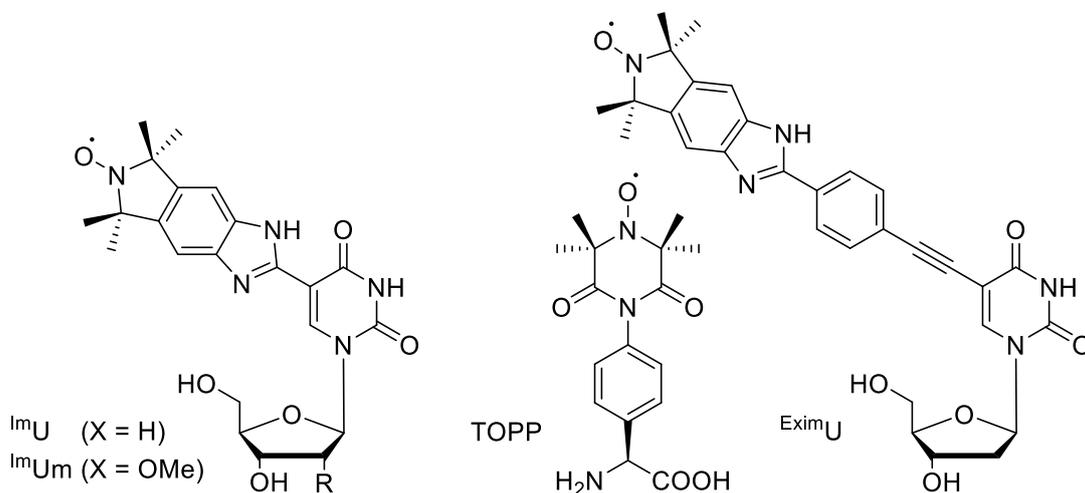


Abbildung 24: Strukturen der konformationell festgelegten Spinlabel ^{lm}U¹⁶⁷, ^{lm}Um¹⁶⁸, TOPP¹⁶⁹ und EximU¹⁶⁶.

Einen Schritt weiter gehen die sogenannten starren oder rigiden Spinlabel. Durch Implementierung des Spinlabels in die bestehende Gerüststruktur des Zielmoleküls, werden Rotationen um Einfachbindungen ausgeschlossen in Ermangelung eben jener. Ein erstes Beispiel lieferte Miller *et al.* mit dQ, einem DNA-Baustein auf Quinolinbasis.^{170,171} dQ benötigt jedoch ein künstliches 2-Aminopurinyl als Basenpartner. Diese Einschränkung konnte mit der Einführung des C-Spins (C)

behalten werden, dessen Struktur sich von Cytidin ableitet und alle funktionellen Gruppen besitzt, um mit Guanosin ein Basenpaar zu bilden.^{172,173} Später wurde die Palette noch um ein RNA-Derivat (ζ m) erweitert und man tauschte die Methylsubstituenten in α -Position gegen Ethylgruppen aus (E ζ und E ζ m).^{174,175} Mit diesen starren Spinlabeln ist es möglich die relative Orientierung zweier Spinlabel zueinander aufzulösen.¹⁷⁶ Grundsätzlich kann es aber beim Einführen systemfremder Komponenten, insbesondere unflexibler Bausteine, zu einer erheblichen Beeinträchtigung der nativen Struktur kommen. Dadurch, dass sich die C-Spins aber in die große Furche legen, führen sie nur zu einer geringfügigen Störung.^{173,174}

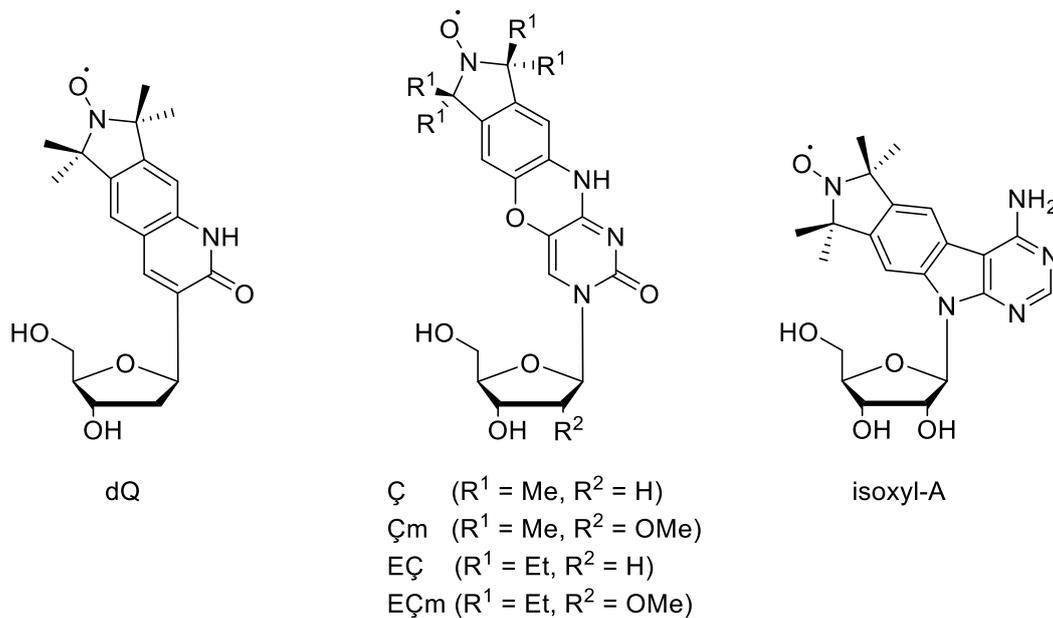


Abbildung 25: Beispielstrukturen für starre Spinlabel auf Basis von Cytidin, Adenosin¹⁷⁷ und Quinolin.

1.5.3.3 Einbau und Position von Spinlabeln

Um ein Spinlabel in ein Nukleotid oder Protein einzubauen, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten. Zunächst muss aber zwischen zwei Konzepten unterschieden werden. Zum einen der Einbau des Labels nach und zum anderen der Einbau während der chemischen bzw. enzymatischen Synthese. Die postsynthetische Modifizierung nutzt modifizierte Bausteine mit speziellen Funktionalitäten, wie Phosphorthioate^{178–180}, Alkine^{181,182}, 2-Aminonukleoside^{183,184}, 2-Azidonukleoside¹⁸⁵, 4-Thiouridine¹⁸⁶, 4-Chlorphenyl als Abgangsgruppe¹⁸⁷ oder Thiole¹⁸⁸ an spezifischen Positionen innerhalb der Sequenz, um diese mit unterschiedlichen Spinlabelreagenzien (siehe Abbildung 26) umzusetzen. Die zuvor eingeführten funktionellen Gruppen müssen dabei eine höhere Reaktivität aufweisen als die vorkommenden exozyklischen Amine der Nucleobasen, nicht verbrückende Sauerstoffatome im Phosphordiester oder das N⁷ in Purinen, um ein Selektivitätsproblem zu vermeiden.

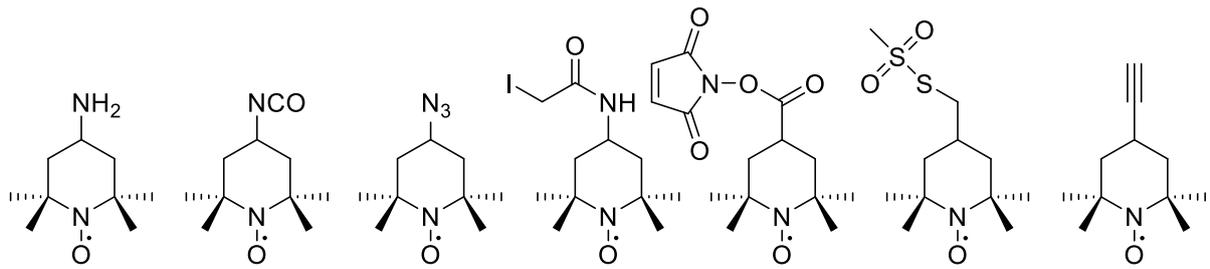


Abbildung 26: Strukturen von Nitroxidreagenzien am Beispiel von TEMPO, die für die postsynthetische Modifizierung von Biomakromolekülen verwendet werden können.

Nukleobasen. Die Nukleobasen sind das beliebteste Ziel, um Nukleotide mit einem Spinlabel zu versehen. Neben einer breiten Palette an Möglichkeiten und Positionen zur Modifizierung der Base kommt, dass die angebrachten Label nur geringen Einfluss auf die Stabilität sich ausbildender Sekundärstrukturen nehmen, da die Reste sich in den Furchen positionieren können. Ramos und Varani¹⁸⁹ nutzten 4-Thiouridin und ein an Iodacetamid gebundenen Spinlabel zum Bilden eines Thioethers, um mittels NMR RNA-Protein-Komplexe zu untersuchen. Borbat *et al.*¹⁹⁰ nutzten die selbe Methode zur Abstandsbestimmung mittels double-quantum coherence (DQC) EPR in einem RNA-Duplex (siehe Abbildung 27A). Nachteilig bei dieser Methode ist, dass Halogenacetamide nicht selektiv mit Thiolen und 4-Thiouridin reagieren¹⁹¹, weswegen häufig Methanthiosulfonate eingesetzt werden (siehe Abbildung 27B).^{188,192} Eine zweite und weitverbreitete Möglichkeit zur Funktionalisierung von Nukleotiden ist die Nutzung von Click-Chemie. Beispielsweise haben Jakobsen *et al.*⁸⁴ mit einem Isoindolinderivat, welches an ein 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin gekuppelt wurde, die Möglichkeit, aufgrund interkalierender Eigenschaften des Labels und den damit einhergehenden Mobilitätsunterschieden, die lokale Umgebung des Spinlabels auf abasische Stellen und Fehlpaarungen innerhalb eines DNA-Duplex zu untersuchen (siehe Abbildung 27C).

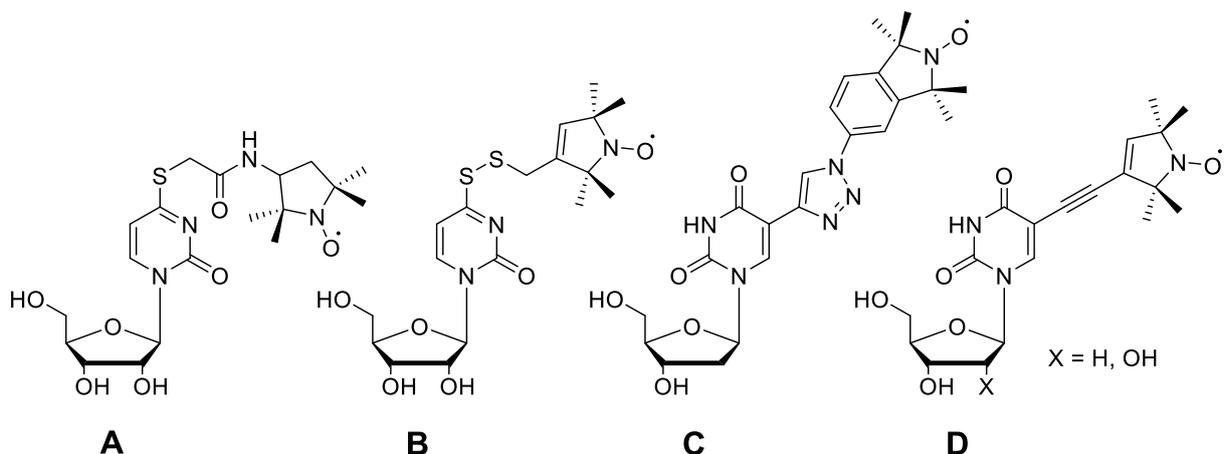


Abbildung 27: Strukturen unterschiedlich spinmarkierter Nukleotide.

Das gleiche Label wurde von Kerzhner *et al.*¹⁸² zur Untersuchung von RNA eingesetzt. Mit dem Einführen von Halogenen, im Speziellen die 5'-Position von Pyrimidinen, können auch Kreuzkupplungsreaktionen verwendet werden, um paramagnetische Nukleotide darzustellen.

Erstmals 1999 durch Khan *et al.*¹⁹³ beschrieben, um DNA am Festphasensupport mit einem Ru-Label zu markieren, haben Strube, Schiemann *et al.*¹⁹⁴ diese Methode erstmals 2001 zur Spinmarkierung von DNA verwendet und später auf RNA erweitert (siehe Abbildung 27D).¹⁹⁵ Exozyklischen Aminogruppen können ebenfalls postsynthetisch modifiziert werden, wofür man die von MacMillan und Verdine etablierten wandelbaren Nukleotide verwendet.^{196,197} Bei dieser Methode wird eine Schutzgruppe z.B. 4-Chlorphenyl oder 2-Fluorinosin nach der Festphasensynthese durch ein Amin ersetzt und gleichzeitig vom Support abgespalten. Sicoli *et al.*¹⁸⁷ haben damit für alle exozyklischen Amine spinmarkierte RNA herstellen können (siehe Abbildung 28). Analog dazu gibt es zahlreiche Publikationen, die Selbiges mit DNA durchführten.^{198–200}

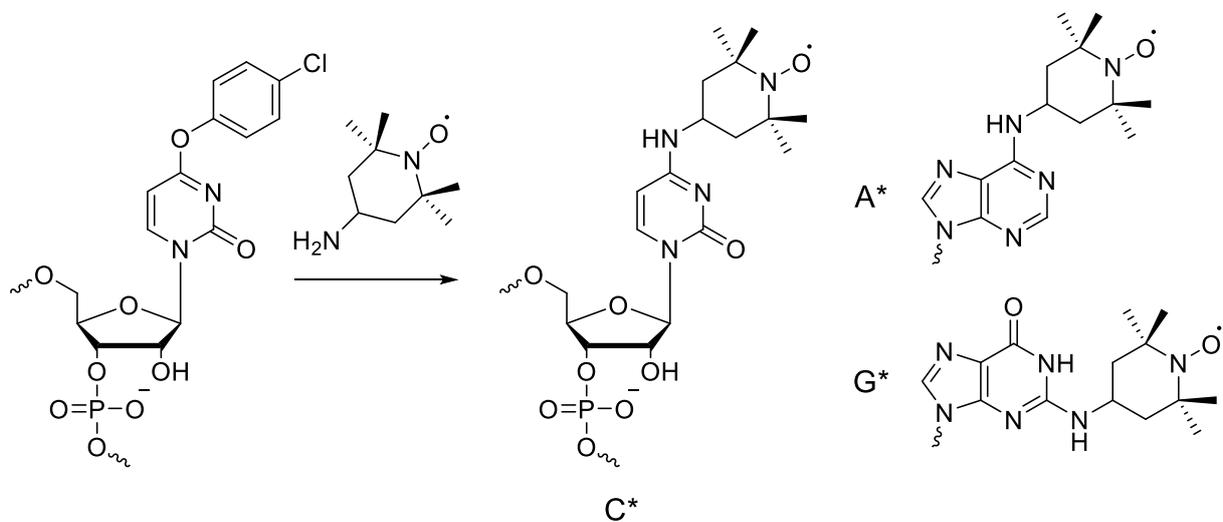


Abbildung 28: Synthese von spinmarkierter RNA unter Verwendung von wandelbaren Nukleotiden am Beispiel von Cytidin (C*), Adenosin (A*) und Guanidin (G*) mit 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy.

Phosphatrückgrat. Das Phosphatrückgrat bietet eine nächste Möglichkeit eine Nukleinsäure mit einem Spinlabel zu markieren und dies an einer von der Base unabhängigen Position. Da die Phosphate an den Kanten der Helices liegen, hätten die daran gebundenen Spinlabel auch nur minimalen Einfluss auf die Stabilität von Sekundärstrukturen. Sowohl interne als auch terminale Phosphate sind zugänglich. Frühe Methoden nutzen für die Modifizierung interne Positionen H-Phosphonate (siehe Abbildung 29A).²⁰¹ Heute werden während der Festphasensynthese gezielt Sulfurierungsreagenzien verwendet, um einen Sauerstoff gegen einen Schwefel auszutauschen, was die Reaktivität deutlich erhöht und selektiv adressiert werden kann (siehe Abbildung 29B).^{179,202,203} Um zusätzlich die Flexibilität des Spinlabel einzuschränken, kann dieser auch an zwei Phosphate gebunden werden. Nguyen *et al.* zeigten dies anhand eines DNA-Duplex (siehe Abbildung 29C).²⁰⁴ Da terminale Phosphate reaktiver als Interne sind, können diese leichter modifiziert werden. Eine Aktivierung mittels Triphenylphosphin und DMAP ist ausreichend und wegen des sterischen Anspruchs auch selektiv. Kuznetsov *et al.* publizierte PELDOR-Messungen mit einem am 3'- und 5'-Ende doppelt markierten DNA-Duplex (siehe Abbildung 29D/E).²⁰⁵

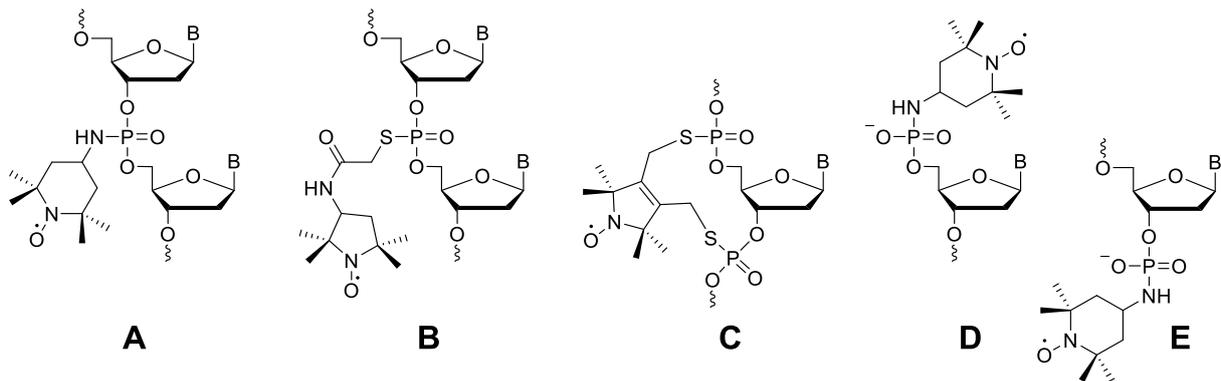


Abbildung 29: Spinlabel die an interne Phosphordiester (A–C) bzw. terminale Phosphate (D und E) gekuppelt sind. B repräsentiert eine Nucleobase.

Sofern ein Phosphordiester in RNA markiert werden soll, müssen benachbarte 2′-Hydroxygruppen durch Wasserstoff oder einen Methoxyrest ersetzt werden, ansonst kommt es zum Strangbruch durch Umesterung.²⁰⁶

Zucker. Die letzte Möglichkeit, um ein Nucleosid kovalent zu markieren, ist die Zuckereinheit. Für interne Modifikationen eignet sich nur die 2-Position, wohingegen 3′- und 5′-Position nur für terminale Einheiten zugänglich sind. An der wenig gehinderten 5′-Position können beispielsweise TAMs angebracht werden. Eine häufige Variante bilden die 2-Aminonucleoside. Diese können mit Isocyanaten^{183,184,207}, Isothiocyanaten²⁰⁸ oder aktivierten Carbonylverbindungen²⁰⁹ zu den entsprechenden Harnstoffen, Thioharnstoffen oder Amiden umgesetzt werden (siehe Abbildung 30A – C). Die Click-Chemie ist ebenfalls zum Einbauen von Spinlabel in der 2′-Position geeignet und benötigt die entsprechende Alkin²¹⁰- bzw. Azid¹⁸⁵-Funktion (siehe Abbildung 30D und E). Linker via Click-Chemie sind im Allgemeinen flexibel und resultieren häufig in einer breiten Abstandsverteilung. Eine Auswahl an Verknüpfungsmotiven zwischen Spinlabel und 2′-Position des Zuckers ist in Abbildung 30 gezeigt.

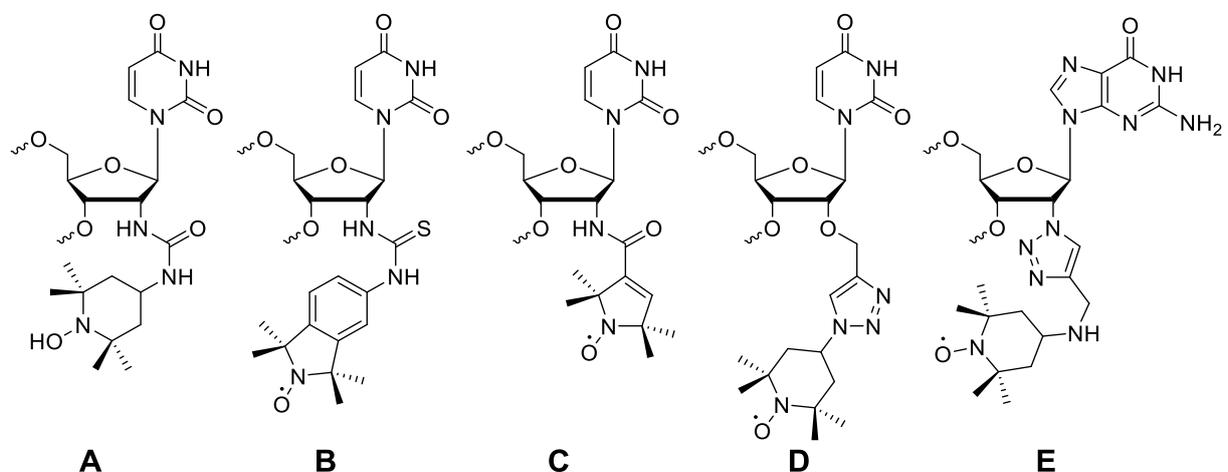


Abbildung 30: Spinlabel, welche über die Zuckereinheit mit der Nucleinsäure verknüpft sind.

Seitenketten von Aminosäuren. Proteine besitzen kein so breites Spektrum an möglichen Positionen zum Labeln wie Nukleinsäuren, es kommen nur die Seitenketten der Aminosäuren in Frage. Insbesondere Cysteine werden aufgrund ihrer einzigartigen Reaktivität und geringen Häufigkeit in Proteinen als Ziel ausgewählt.²¹¹ Die Spinlabel werden typischerweise als Disulfide über Methylthiosulfonate oder Thioether mittels 1,4-Addition an Maleimide angebracht (siehe Abbildung 26). An den gewünschten Positionen müssen, sofern nicht bereits vorhanden, über Mutagenese Cysteine eingeführt werden, sowie natürlich vorkommende Cysteine auf gleiche Weise entfernt werden, um selektiv Spinlabel einführen zu können. Das Entfernen bzw. Hinzufügen von Cysteinen beeinflusst unter anderem auch die biologische Aktivität des Proteins.²¹² Alternativ können nichtkanonische Aminosäuren, die bereits einen Spinlabel oder eine reaktive Gruppe für eine spätere Funktionalisierung beinhalten, über Peptidfestphasensynthese oder unter zur Hilfenahme eines orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase Paares für die entsprechende Aminosäure, eingebaut werden. Eine Auswahl verschiedener nicht kanonischer Aminosäuren ist in Abbildung 31 gezeigt. Das *p*-Acetyl-*L*-phenylalanin (Abbildung 31A) wurde erstmals von Fleissner *et al.* für das Markieren eines T4-Lysozyms verwendet. Das Keton wird hierbei mit einem Hydroxylamin zu einem Oxim umgesetzt.²¹³ Die benötigten Reaktionsbedingungen limitieren den Einsatz in in-cell Experimenten. Deutlich effizienter und leichter zu handhaben sind die Kupfer(I)-katalysierten Alkin-Azid-Kupplungen (siehe Abbildung 31B/C). Sie bieten eine schnelle Reaktionskinetik, hohe Ausbeuten und können auch in Zellen eingesetzt werden.^{214–216} Die Click-Reaktion kann aber auch kupferfrei durchgeführt werden, um kupfervermittelte Zelltoxizität zu vermeiden. Dafür benötigt es ein gespanntes Alkin in Form eines Achtrings.²¹⁷ Schmidt *et al.* zeigten außerdem anhand des Einbaus von E (siehe Abbildung 31) in Thioredoxin, dass man nicht notwendigerweise den Label postsynthetisch einbauen muss.²¹⁸

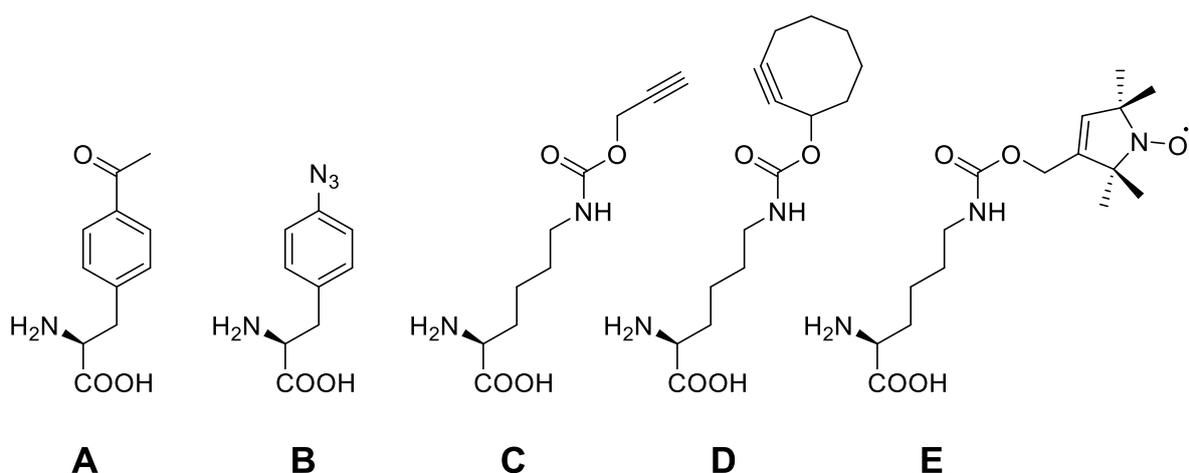


Abbildung 31: Strukturen nichtkanonischer Aminosäuren, die bereits für die Synthese spinmarkierter Proteine eingesetzt wurden.

Neben dem postsynthetischen Modifizieren, können Spinlabel auch während der chemischen Synthese (Festphasensynthese) der Nucleinsäuren, unter Verwendung spinmarkierter Phosphoramidite, erhalten werden. Auf diese Art und Weise können komplexe Spinlabel, wie C-Spin oder isoxyl-A eingebaut werden, die mit postsynthetischen Methoden nicht kompatibel wären. Zudem muss man keine Selektivitätsprobleme seitens Spinlabelreagenzien oder Labelingeffizienz befürchten. Jedoch wird ein gewisser Mehraufwand zur Darstellung der Phosphoramidite betrieben. Ein Überblick über die Funktionsweise der Festphasensynthese verschafft Abbildung 32.

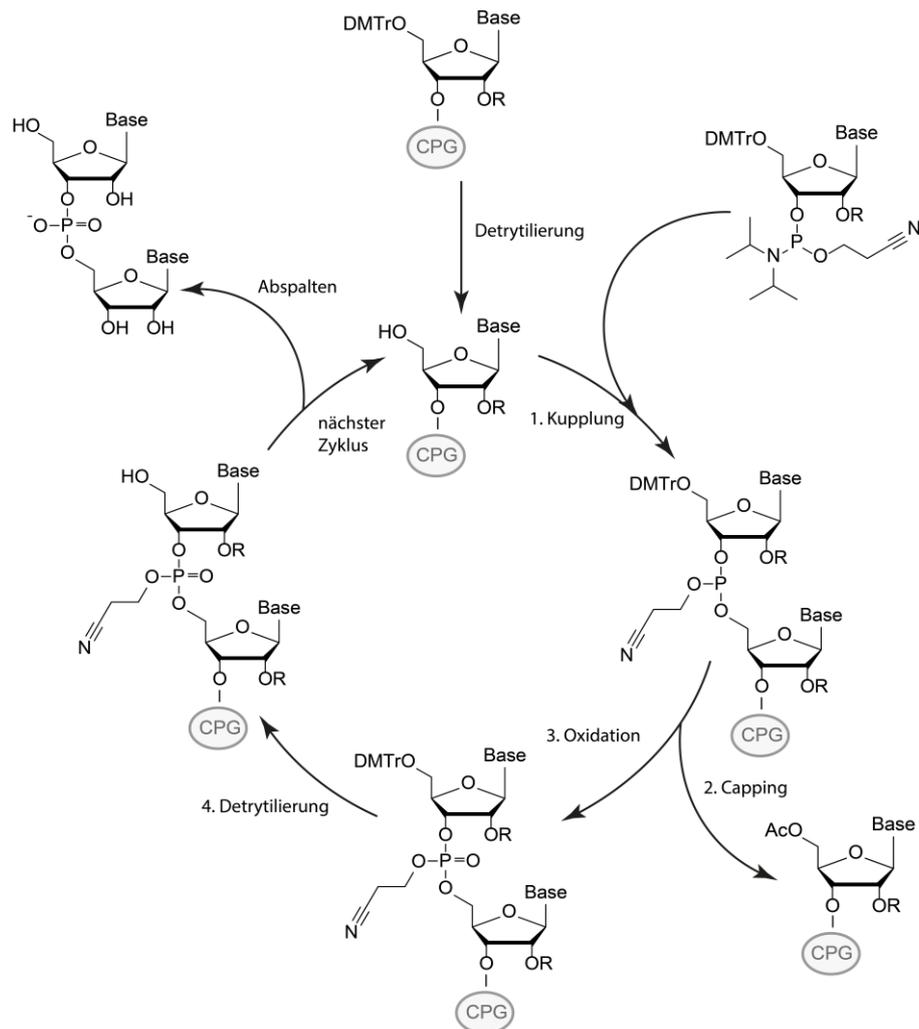


Abbildung 32: Festphasensynthese von RNA mittels Phosphoramiditen. R = 2'-Silylschutzgruppe, CPG = Festphasensupport.

Gestartet wird meist mit einem auf CPG (controlled pore glass) basierenden Festphasensupport, an den bereits die erste Base gekuppelt ist. Nach einem ersten Detritylierungsschritt mit Trichloressigsäure (TCA), welcher die 5'-Hydroxygruppe freilegt, wird diese mit einem zuvor aktivierten Phosphoramidit gekuppelt. Zum Aktivieren des Phosphoramidits wird ein auf Tetrazol basierender Aktivator verwendet, wie 5-Ethylthio-1H-tetrazol²¹⁹ oder 5-Benzylthio-1H-tetrazol²²⁰. Damit während der Kuppelung nur die 3'-5'-Verknüpfung stattfindet, müssen reaktive Gruppen über Schutzgruppen maskiert werden. Bei kommerziell erhältlichen Amiditen ist die 5'-Hydroxygruppe mit

4,4'-Dimethoxytrityl geschützt. Exozyklische Aminogruppen werden je nach Nukleobase und Abspaltbedingungen unterschiedlich behandelt. Adenosine werden mit Acetyl (Ac), Benzoyl (Bz) oder Phenoxyacetyl (PAC) geschützt, Cytidine mit Bz oder Ac und Guanidine tragen Isopropylphenoxyacetyl (iPrPAC), Isobutyryl (iBu) oder Dimethylformamidino (DMF).²²¹⁻²²⁴ Zusätzlich muss bei der Synthese von RNA die 2'-Hydroxygruppen geschützt werden. Dies geschieht meist über Silylschutzgruppen wie *tert*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)^{225,226} oder Tri-*iso*-propylsilyloxymethyl (TOM)^{227,228}. Außerdem muss sowohl bei DNA und RNA der Phosphor geschützt werden, was mit 2-Cyanoethylgruppen geschieht.²²⁹ Nach dem Kupplungsschritt müssen nicht reagierte Hydroxygruppen durch Acetylierung deaktiviert werden. Anschließend wird der Phosphor mit Iod oxidiert und die 5'-Hydroxygruppe für einen neuen Zyklus erneut entschützt. Nach dem Erreichen der gewünschten Länge kann durch Inkubation mit Ammoniak oder Methylamin die Nukleinsäure vom Träger abgespalten werden. Dies entfernt auch gleichzeitig die Schutzgruppen der Nukleobasen und des Phosphors. Silylgruppen müssen zusätzlich noch mit Fluorid abgespalten werden.

Sollen über die Phosphoramiditmethode Spinlabel in Nukleinsäuren eingebaut werden, steht man dem Problem gegenüber, dass Nitroxidradikale unter den vorherrschenden Bedingungen nicht stabil sind. Die Oxidation mit Iod^{230,231} und die Detritylierung mit TCA^{231,232}, die standardmäßig eingesetzt werden, führen zu einem Abbau des Radikals. Durch Abändern der Bedingungen kann dem entgegengewirkt werden. Iod wird gegen *tert*-Butylhydroperoxid²³² und TCA gegen die mildere Dichloressigsäure (DCA)¹⁷³ ausgetauscht. Bei Verwendung der ACE-Chemie können statt DCA Fluoridionen zum Abspalten der 5'-Schutzgruppe verwendet werden.²³² Juliusson *et al.*¹⁷⁵ zeigte zudem, dass durch den Einsatz sterisch anspruchsvoller Substituenten, die Ausmaße an Degradation des Radikals reduziert werden. Um das Problem mangelnder Radikalstabilität vollständig zu vermeiden, kann das Radikal durch Schutzgruppen maskiert werden. Methyl, Benzyl oder TBDMS wurden als Schutzgruppen für Nitroxide untersucht, haben sich jedoch im Kontext der Nukleinsäuren nicht durchsetzen können. Entweder hat die Abspaltung zu Nebenreaktionen bei den Nukleobasen geführt oder die Wiedergewinnung des Radikals war ungenügend, was vor allem für PELDOR-Messungen kritisch zu bewerten ist.²³³⁻²³⁵ Juliusson *et al.* verwendeten eine Benzoylgruppe, um das Nitroxid zu schützen. Diese können leicht eingeführt werden, sind während der Festphasensynthese stabil, lassen sich im Rahmen der Aufarbeitung leicht entfernen und liefern exzellente Radikalausbeuten (siehe Abbildung 33).^{175,236} Der Nachteil dieser Art von Schutzgruppe, welche bei der Aufarbeitung unweigerlich verloren geht, ist, dass eine nachträgliche Verlängerung mittels Ligation ohne Zersetzung des Radikals schwer möglich ist. Bei der Länge von spinmarkierten Nukleinsäuren ist man demnach auf die technischen Grenzen der Festphasensynthese festgelegt. Ursächlich für die Komplikationen zwischen Radikal und Ligation sind die verwendeten thiolhaltigen Puffer.²³⁷

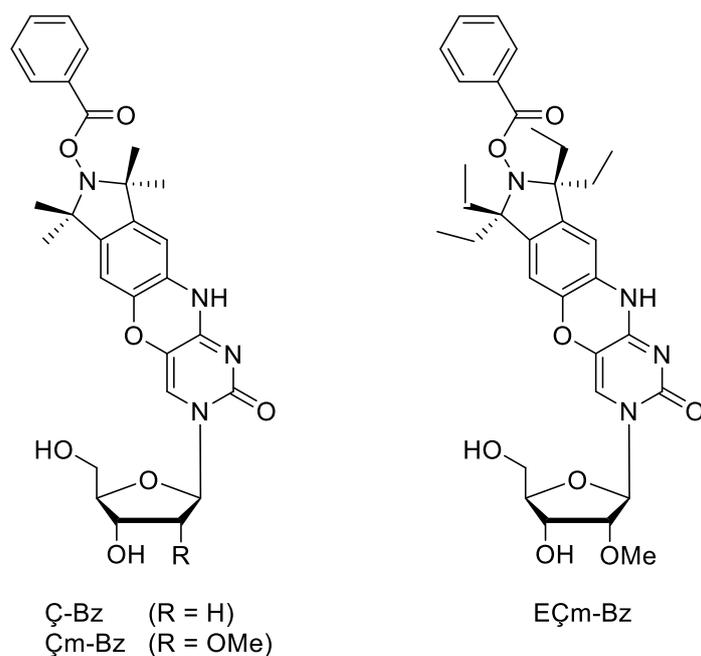


Abbildung 33: Starre Spinlabel aus der Familie der C–Spins, bei welchen das Radikal durch eine Benzoylgruppe geschützt wurde.

Um einen allgemeineren Lösungsansatz hinsichtlich Nitroxidstabilität bieten zu können, hat unsere Arbeitsgruppe eine Schutzgruppenstrategie entwickelt, die auf der Alkylierung von Nitroxiden mit lichtsensitiven Gruppen beruht. Zunächst entwickelten wir eine Coumaringruppe zum Schutze des Radikals (siehe Abbildung 34A).^{238,239} Die daraus resultierenden Amidite sind unter Standardbedingungen am Synthesizer einbaubar und stabil. Die Photolyse setzt das Hydroxylamin frei, welches durch Luftsauerstoff zum Nitroxidradikal oxidiert wird, eine nochmalige Reinigung ist nicht erforderlich.²³⁹ Es zeigte sich jedoch, dass auch unter optimalen Bedingungen sich zu etwa 15% das unerwünschte Amin bildete.²³⁸ Mit dem Ziel den Verlust des Nitroxids zu verringern, positionierte man einen Linker zwischen Nitroxid und Abgangsgruppe.

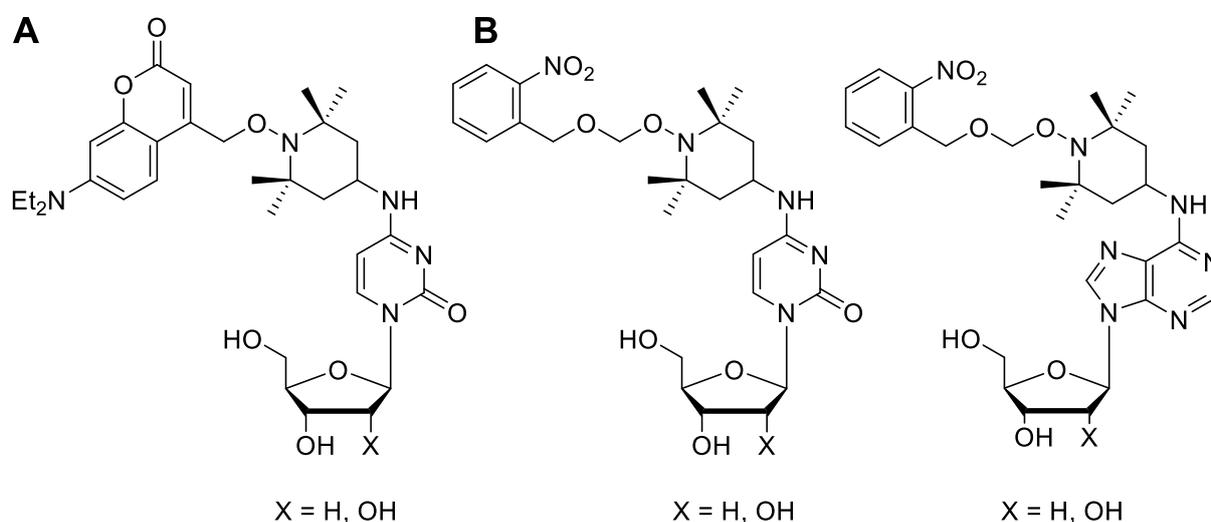


Abbildung 34: Spinmarkierte Nukleotide, die mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen sind.

Dies resultierte in der Verwendung von 2-Nitrobenzyloxymethylgruppen (NBOM) zum Schutz des Radikals (siehe Abbildung 34B). NBOM ist stabil unter Ligations- und Festphasenbedingungen und lässt sich ohne Photoschäden entfernen, muss anders als Coumarin jedoch erhitzt werden, um den Linker in Form von Formaldehyd zu eliminieren.^{238,240,241}

Wie bereits vorhin erwähnt sind lange, modifizierte Nucleinsäuren zwar wünschenswert, können aber nicht an einem Stück mittels Festphasensynthese dargestellt werden. Es ist zunächst notwendig kürzere Teilstränge zu synthetisieren und diese dann mittels Ligation zusammenzufügen. Die Wahl der Ligationmethode ist davon abhängig, ob und welche Modifikationen in den Teilsträngen vorhanden sind. Um Nucleinsäuren mit freien Radikalen ligieren zu können, entwickelten Büttner *et al.* auf Basis eines Desoxyribozoms eine thiofreie Ligationvariante.²³⁷ Die 3'- und 5'-Enden des Desoxyribozoms hybridisiert mit den RNA-Substraten und präorganisieren die 3'-Hydroxygruppe (Donor) und das 5'-Triphosphat (Akzeptor). Das aktive Zentrum verknüpft unter Zuhilfenahme von Metallionen als Cofaktoren die beiden Enden miteinander (siehe Abbildung 35B). Nucleinsäuren mit geschützten Nitroxiden können auch mittels unterschiedlicher Ligasen (T4 RNA Ligase I²⁴², T4 DNA Ligase²⁴³ oder T4 RNA Ligase II²⁴⁰) und einem Splint verknüpft werden (siehe Abbildung 35A).²⁴⁰

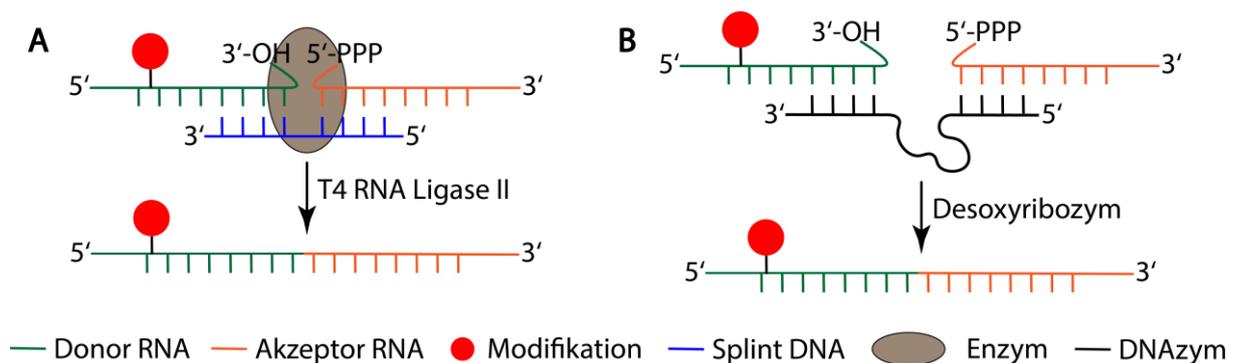


Abbildung 35: Schematische Darstellung einer Ligation mittels T4 RNA Ligase II (A) und einer Ligation mittels Desoxyribozym (B), die für ungeschützte Nitroxide geeignet ist.

Eine Alternative zum Ligieren einzelner Teilstränge, bietet die enzymatische Synthese von Nucleinsäuren und damit eine Methode, die nicht hinsichtlich der erreichbaren Kettenlänge limitiert ist. Auf Basis eines DNA-Templats verknüpft eine Polymerase Triphosphate der modifizierten Nucleotide miteinander. Ein grundlegendes Problem dieser Methode stellt die Spezifität da, sofern sich die Template nur aus den kanonischen Basen A, T, C und G zusammensetzen. Das modifizierte Nucleosid könnte an zu vielen Stellen eingebaut werden, sodass nur Basenkombinationen in Frage kämen, in welchen eine Base einzeln auftritt.²⁴⁴ Eine Weiterentwicklung stellen nichtkanonische Basenpaare dar. Diese erweitern das genetische Alphabet und können an beliebiger Stelle des Templatestrangs eingebaut werden. Die Polymerase baut so an der Position mit der nichtkanonischen Base im Gegenstrang den entsprechenden komplementären Partner ein, welcher mit einem Spinlabel oder einer funktionellen Gruppe modifiziert worden ist (siehe Abbildung 36). Domnick *et al.*²⁴⁵ gelang

es auf diese Weise spinmarkierte Nucleinsäuren mit Längen von 185 sowie 377 Nucleotiden darzustellen und spektroskopisch zu vermessen.

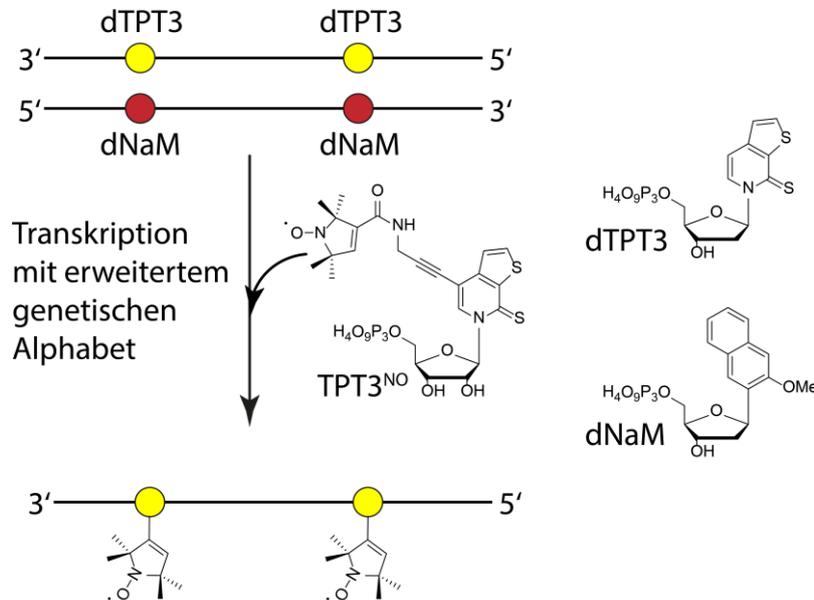


Abbildung 36: Strategie zur Darstellung langer spinmarkierter RNAs über ein erweitertes genetisches Alphabet. Die Abbildung wurde [237] entnommen.

Die letzte Möglichkeit, die hier vorgestellt wird, um ein Spinlabel in eine Nucleinsäure einzuführen, ist das sogenannte „noncovalent spin-labeling“. Wie der Name bereits verrät, wird der Spinlabel nicht direkt an ein Nucleosid gebunden, sondern tritt über Wasserstoffbrücken und π - π -Wechselwirkungen mit der RNA/DNA in Kontakt. Die Herausforderung besteht darin, mit dem Spinlabel eine hohe Affinität und Spezifität zum gewünschten Ziel zu erreichen. Eine Idee beruht darauf, sich Paarung zu Nutze zu machen. Deswegen beruht das Design des Labels auf einer Nucleobase, um eine Paarung mit der komplementären Base zu erreichen. Für die Basenpaarung muss jedoch zuvor eine abasische Stelle geschaffen werden, um den nötigen Platz liefern zu können. Ein Beispiel für diesen Ansatz bildet das von Kamble *et al.*²⁴⁶ publizierte \acute{G} (siehe Abbildung 37).

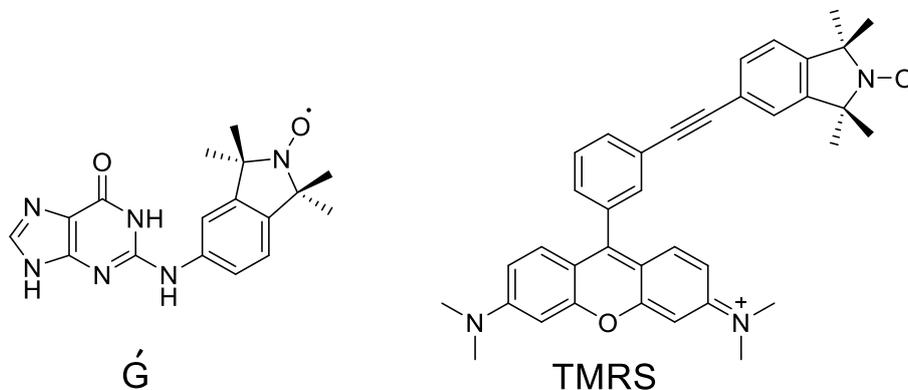


Abbildung 37: Strukturen für die beiden nichtkovalent bindenden Spinlabel \acute{G} (links) und TMRS (rechts).

Saha *et al.*²⁴⁷ zeigte, dass es prinzipiell auch ohne eine Modifizierung der Nukleinsäure möglich ist, RNA zu markieren. Der auf Tetramethylrosamin basierende Spinlabel TMRS (siehe Abbildung 37) wird mit hoher Spezifität vom Malachit Grün Aptamer (MG) erkannt. Da das MG in biologisch relevanten RNAs nicht weit verbreitet sei und die Form einer Helix entspricht, so die Autoren, sollte es möglich sein, für EPR-Studien Helix oder Stamm–Schleifen–Motive mit der MG–Sequenz zu ersetzen.²⁴⁷

2 Zielsetzung

Um biologische Prozesse zu verstehen, gilt es die Mechanismen, nach denen diese ablaufen, nachvollziehen zu können. Dafür stehen unterschiedlichste Methoden zur Verfügung und eine davon ist EPR. Da für EPR paramagnetische Zentren im Zielmolekül vorhanden sein müssen und die meisten von Natur aus keine solchen Zentren besitzen, müssen diese über sogenannte Spinlabel eingeführt werden. Ein Großteil der markierten Biomakromoleküle stammt aus chemischen Synthesen und man kann diese während oder nach der Synthese mit dem Spinlabel markieren. Unsere Arbeitsgruppe hat sich dabei auf die Entwicklung von Phosphoramiditen spezialisiert, die in der Festphasensynthese unter Standardbedingungen einbaubar sind. Ermöglicht wird dies über das Maskieren des labilen Nitroxidradikals mittels einer photolabilen Schutzgruppe. Erste Arbeiten dazu publizierten Seven, Weinrich *et al.*²³⁹ und später Weinrich *et al.*^{238,240,241} mit Cytidinen und Adenosinen, die jeweils an ihrer exozyklischen Aminogruppe mit einem geschützten TEMPO versehen waren. Die Verwendung des TEMPOs an besagter Stelle der Nucleobase, führt aber je nach Position in der Sequenz zu einer Destabilisierung der Sekundärstruktur von 6 – 10 °C pro Spinlabel.¹⁸⁷ Das Ziel dieser Arbeit ist die bestehende Palette um geschützte RNA-Phosphoramiditbausteine zu erweitern. Der Spinlabel soll aber nicht mehr auf TEMPO basieren, sondern ein TPA-Gerüst besitzen. Dies, in Kombination mit einem Wechsel der Verknüpfungsstelle mit der Nucleobase, sodass keine Watson-Crick-Gruppen involviert sind, soll zu einem deutlich reduzierten Einfluss der Label auf die Sekundärstruktur führen. Außerdem soll das Konzept der geschützten Spinlabel auf Aminosäuren übertragen werden (siehe Abbildung 38).

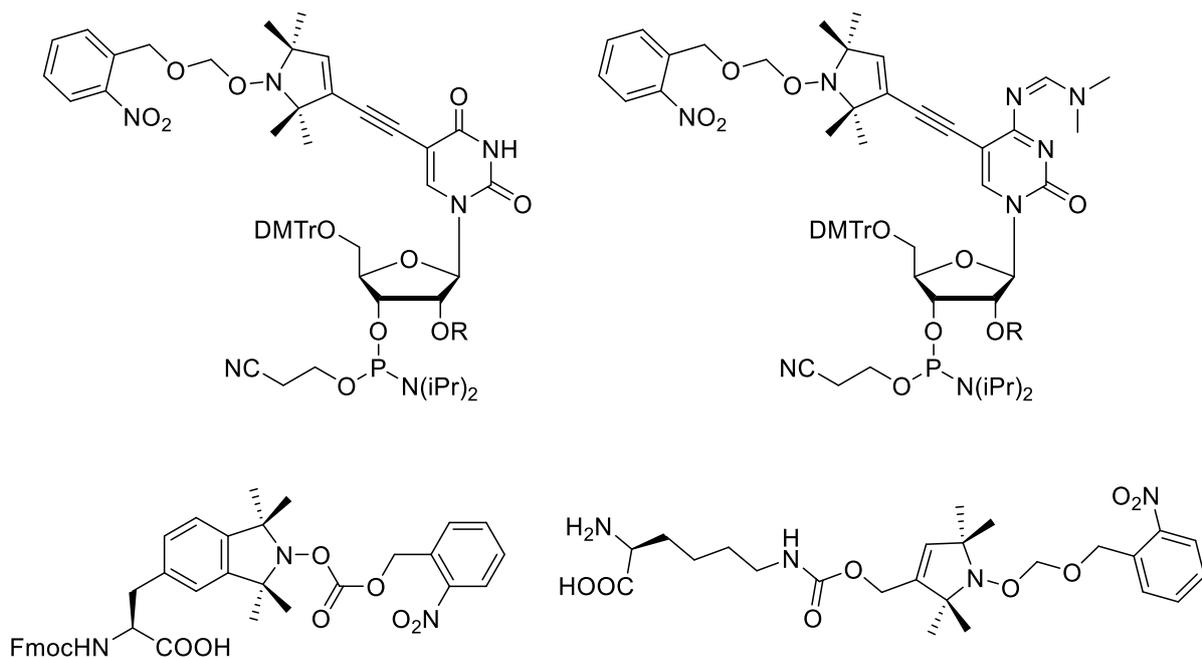


Abbildung 38: Geschützte Spinlabel für Nucleinsäuren und Proteine.

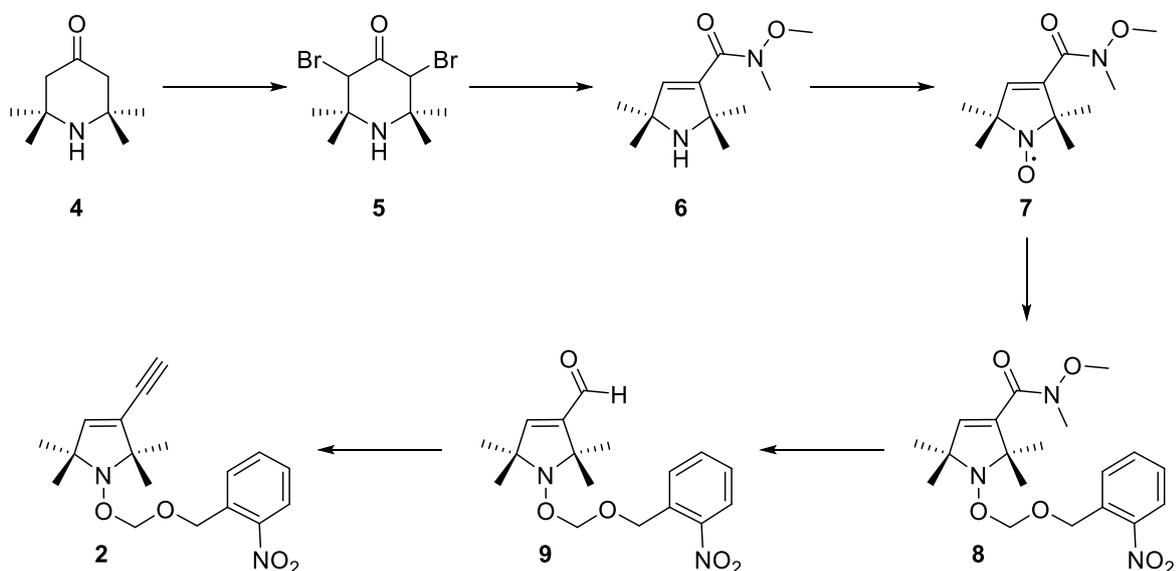
3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Spinlabel für den Einsatz in der RNA–Festphasensynthese

In diesem Abschnitt soll die Darstellung des Uridin– sowie Cytidinbausteins für die RNA–Festphasensynthese behandelt werden, beginnend mit der Syntheseplanung beider Zielmoleküle. Im Anschluss folgt die Anwendung des Uridinbausteins gefolgt von einer Zusammenfassung und Ausblick auf weiterführende Fragestellungen.

3.1.1 Uridinbaustein

Syntheseplanung. Das fertige Phosphoramidit **1** setzt sich aus zwei Bausteinen zusammen, die erst spät in der Synthese über eine Sonogashira–Kupplung miteinander verbunden werden sollen, um eine lange konsekutive Syntheseroute und den mit einhergehenden Ausbeuteverlust zu vermeiden. Den ersten Baustein bildet der geschützte Spinlabel **2**, welcher die Alkingruppe für die spätere Kupplung beinhaltet. Ausgehend von 2,2,6,6–Tetramethylpiperidin–4–on (**4**) soll über mehrere Schritte der Sechsring über eine Faworski–Umlagerung in das TPA–Gerüst **6** umgewandelt werden. Anschließend Oxidation zum Radikal und der nachfolgenden Schützung würden einen stabilen Vorläufer **8** ergeben, welcher über Reduktion und Ohira–Bestmann–Reaktion in den geschützten Spinlabel **2** überführt würde. Den zweiten Baustein bildet das Nukleosid **3**. Dieser trägt in 5–Position, das für die Sonogashira–Kupplung benötigte Iod. Uridin müsste zunächst iodiert und anschließend erst in 5′–Position mit Dimethoxytrityl (DMTr) und dann in 3′–Position mit Tri–*iso*–propylsilyloxymethyl (TOM) geschützt werden. TOM bietet gegenüber TBDMS den Vorteil einer erhöhten Kupplungsausbeute während der Festphasensynthese.²⁴⁸ Die Syntheseroute ist in Abbildung 39 gezeigt.



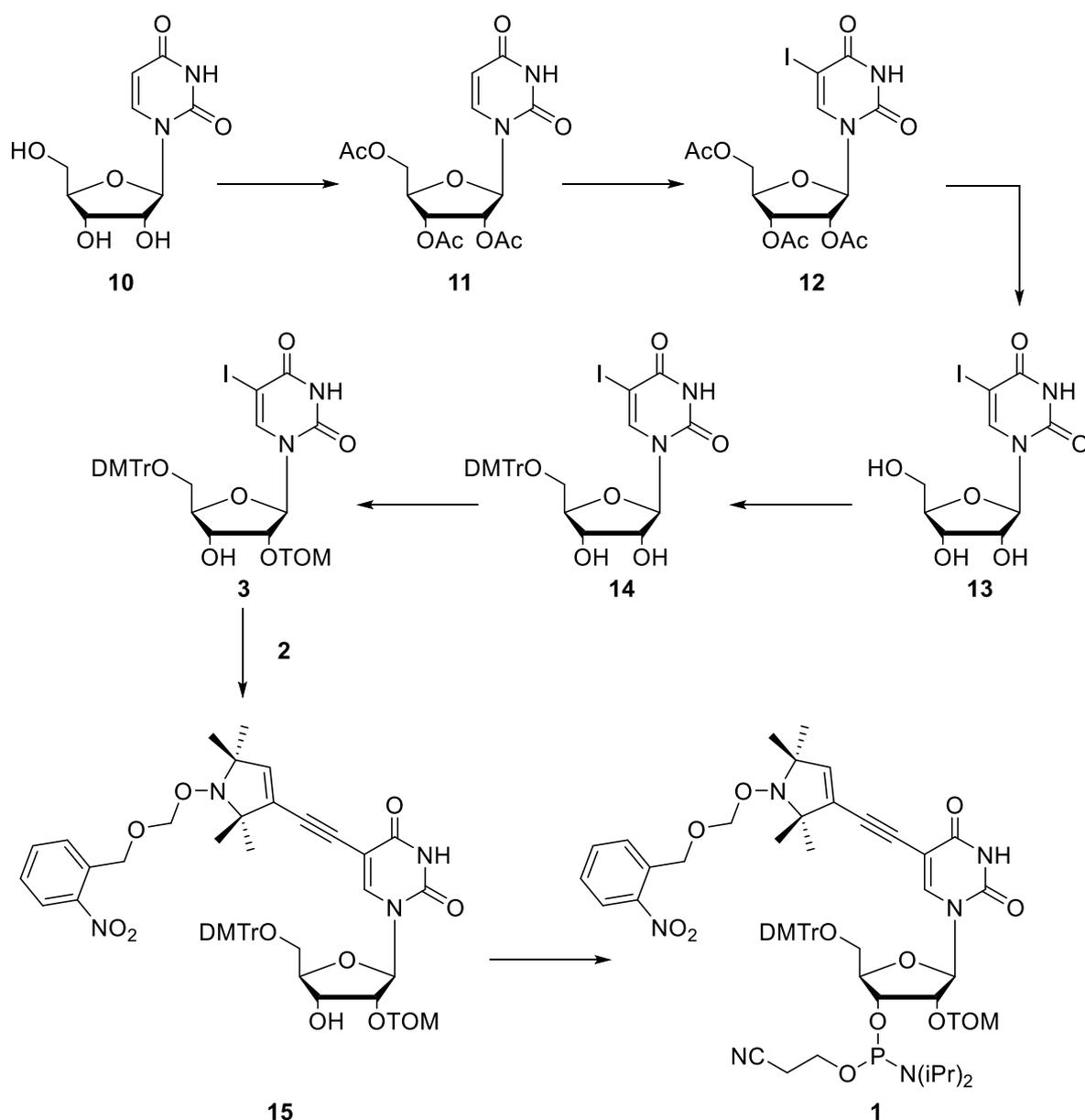


Abbildung 39: Geplante Syntheseroute für den auf Uridin basierenden photolabil geschützten Spinlabel 1.

Darstellung des geschützten Spinlabel 2. Der Startpunkt der Synthese bildet das kommerziell leicht erhältliche 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on (4), welches in einer ersten Reaktion mit Brom in das 3,5-Dibromderivat 5 in sehr guten Ausbeuten umgesetzt werden konnte (siehe Abbildung 40).²⁴⁹ Die Halogenierung in α -Position ermöglicht einer Faworski-Umlagerung, um den Sechsring in den für

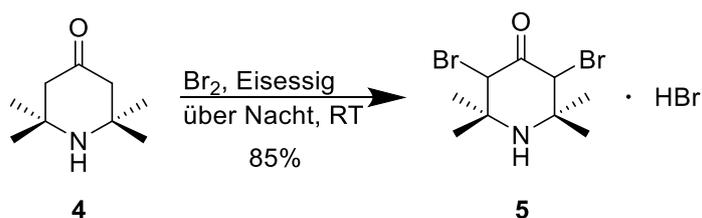


Abbildung 40: Synthese von *meso*-3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on (5).

Radikale günstigeren Fünfring zu überführen. Dafür wurde das Dibromderivat **5** mit *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (**16**) in Gegenwart einer Base, zuständig für die Enolisierung, umgesetzt (siehe Abbildung 41). Das gebildete Weinrebamid ermöglicht in späteren Syntheseschritten die Schützung des Radikals mit der photolabilen Schutzgruppe sowie die leichte Umsetzung in einen Aldehyd, welcher für die Alkylsynthese benötigt wird. Führt man die analoge Reaktion mit einem Alkoholat durch, welche unter Bildung eines Esters abläuft, bekäme man Schwierigkeiten bei der Schützung des Radikals mit der photolabilen Schutzgruppe, denn ein Ester ist unter den Reaktionsbedingungen (siehe Abbildung 43) nicht stabil. Außerdem ist die Umsetzung des Weinrebamids in einen Aldehyd, dank seines stabileren Übergangszustandes, weniger fehleranfällig.

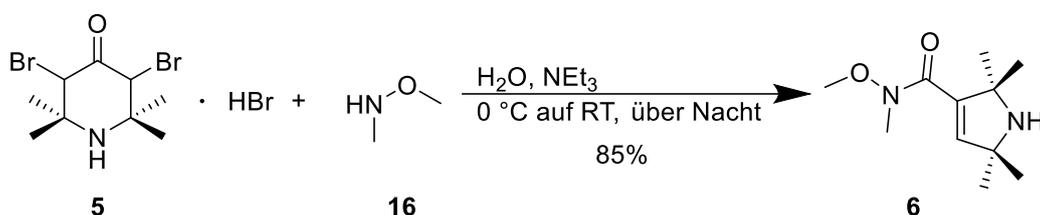


Abbildung 41: Synthese des Weinrebamids **6**.

Mittels *m*CPBA konnte Weinrebamid **6** problemlos und in sehr guten Ausbeuten zum entsprechenden Nitroxid **7** oxidiert werden (siehe Abbildung 42).



Abbildung 42: Synthese von Nitroxid (**7**) durch Oxidation des Weinrebamids **6** mittels *m*CPBA.

Der nächste Schritt ist das Schützen von Nitroxid **7** mit der photolabilen Schutzgruppe, einem der Schlüsselschritte der Synthese. *ortho*-Nitrobenzylalkohol (**17**) setzte man zunächst in einer Pummerer-Umlagerung mit DMSO zu Thiomethylether **18** gemäß Yong *et al.*²⁵⁰ um (siehe Abbildung 43). Ansätze von über 33 mmol resultieren jedoch in deutlich reduzierten Ausbeuten. Über eine Substitution des DMSO mit beispielsweise Diethylsulfoxid ließe sich auch an der Schutzgruppe eine zusätzliche Methylgruppe einfügen. Das Einfügen von Substituenten beeinflusst unter anderem das spätere Abspalten der Schutzgruppe sowie die Stabilität während der Festphasensynthese. Generell gelingt durch die Pummerer-Umlagerung das Einfügen eines Spacers zwischen Radikal und der photoreaktiven Schutzgruppe, was in einer erheblichen Verbesserung der Wiedergewinnung des Radikalcharakters nach Entschützung resultiert. Vorausgehende Versuche, in welchen ein *ortho*-Nitrobenzylbromid direkt an das Radikal gekuppelt worden ist, zeigten, dass nach Entschützung etwa zur Hälfte das unerwünschte Amin entsteht, welches nicht mehr durch Luftsauerstoff zum Radikal

oxidiert werden kann und somit nicht mehr für EPR-Messungen zur Verfügung steht.²⁵¹ Dies ist insbesondere für PELDOR-Messungen, mit mindestens zwei Labeln pro Molekül, problematisch.

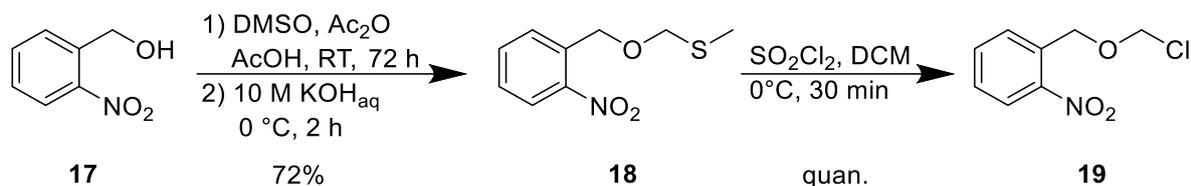


Abbildung 43: Synthese der NBOM-Schutzgruppe ausgehend von *ortho*-Nitrobenzylalkohol über eine Pummerer-Umlagerung mit anschließender Chlorierung.

Der Thiomethylether **18** wird im Anschluss mit Sulfurylchlorid chloriert. Hierbei ist es für die anschließende Reaktion wichtig, dass die Chlorierung nicht zu lange gerührt oder zu warm wird, da sich sonst Nebenprodukte in signifikanter Menge bilden würde. Ebenfalls ist eine gründliche Aufreinigung der Chlorierung unerlässlich. Leider lässt sich das Molekül weder destillieren noch säulenchromatographisch reinigen. Die Überführung des Thiomethylethers **18** in das Chlorid **19** ermöglicht in einem weiteren Schritt eine kupfer(I)-vermittelte Radikalbildung, welches in einer Rekombination mit dem Nitroxid **7** den geschützten Spinlabel **8** ergibt (siehe Abbildung 44).

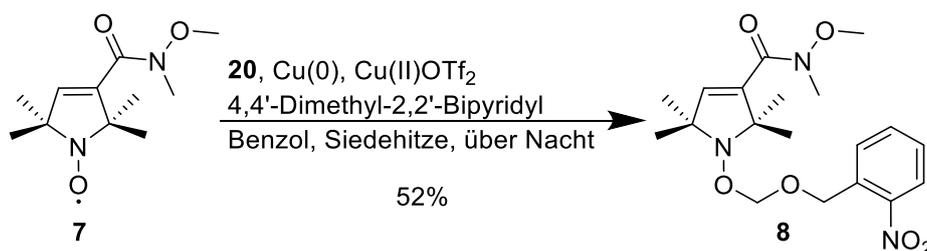


Abbildung 44: Synthese des geschützten Spinlabel **8**.

Die Ausbeuten, die bei gleicher Reaktionsführung mit dieser Reaktion erzielt werden, variieren stark, zwischen 30 und 50% sind typischerweise zu erwarten. Neben Kupfer(II) beinhaltet die Reaktion noch elementares Kupfer und ein Bipyridyl. Das elementare Kupfer sorgt in einer Komproportionierung mit dem Kupfer(II), sodass immer wieder neues Kupfer(I) gebildet wird. Das Bipyridyl dient der Löslichkeit der Kupferspezies. Wegen der stark variierenden Ausbeuten wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen untersucht, um möglicherweise einen Trend feststellen zu können (siehe Tabelle 1). Aus der Versuchsreihe ist zum einen ersichtlich, dass ein equimolarer Anteil von Kupfer(I) zu einer deutlich reduzierten Ausbeute führt, was verständlich ist, da mit viel Kupfer(I) auch viel Radikal erzeugt wird und die Rekombination zum Dimer wahrscheinlicher wird, zumal Verbindung **7** sterisch weniger leicht zugänglich ist. Aus dieser Überlegung wurde die Zugabe der chlorierten Schutzgruppe in Portionen unterteilt damit weniger Radikal zur gleichen Zeit gebildet werden kann. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbeute. Möglicherweise muss die Zugabe noch kleinteiliger, beispielsweise über eine Spritzenpumpe erfolgen, um einen Effekt erzielen zu können. Zum anderen haben erhöhte

Temperaturen einen negativen Einfluss auf die Ausbeute. In einem weiteren Experiment wurde nur das Radikal in Toluol zum Sieden erhitzt, wobei sich das Radikal mit der Zeit zersetzte. Ansonst zeigte eine Variierung der Konzentrationen der einzelnen Komponenten wenig Einfluss auf die Ausbeute der Reaktion. Ein Kompensieren der schlechten Ausbeute durch das Skalieren der Ansätze ist nicht empfehlenswert. Die maximal erzielten Ausbeuten der Reaktion stehen in Einklang mit denen von Weinrich *et al.*^[240] publizierten Daten auf Basis des TEMPO–Radikals.

Tabelle 1: Unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Schützung von **7** mit NBOM.

No.	Lösungsmittel	Cu(I)OTf ₂	20	Bipyridyl	Ausbeute [%]
1	Toluol	0.05 eq	1.5 eq	0.15 eq	26 – 45
2	Benzol	0.05 eq	1.5 eq	0.15 eq	33 – 52
3	Benzol	1.0 eq	1.5 eq	0.15 eq	16 – 27
4	Benzol	0.05 eq	1.0 + 1.0 eq	0.15 eq	32 – 50
5	Benzol	0.10 eq	1.5 eq	0.30 eq	31 – 51

Trotz großer Sorgfalt bei der Reaktionsdurchführung, ist es dennoch wahrscheinlich, dass die Chlorierung der Schutzgruppe mangels möglicher Reinigung das Problem darstellt. Eine säulenchromatographische wie auch eine destillative Aufarbeitung führt unweigerlich zur Zersetzung der reaktiven Zwischenstufe. Ein Indiz dafür, dass die Reinheit der Schutzgruppe ausschlaggebend sein könnte, stellt die Schützung des Radikals **7** mit 2–Nitrobenzylbromid dar. Die Reaktion gelingt durchweg mit über 80% Ausbeute, in welcher das Bromid mit 98%-iger Reinheit eingesetzt wurde. Jedoch könnte auch die höhere Stabilität des gebildeten Benzylradikals die gesteigerte Ausbeute erklären.

Im nächsten Schritt erfolgt die Reduktion des geschützten Weinrebamids **7** mit DIBAL zum entsprechenden Aldehyd **9** (siehe Abbildung 45). Der Aldehyd lässt sich in ausgezeichneten Ausbeuten isolieren. Lediglich bei der Aufarbeitung ist darauf zu achten, dass die verdünnte Salzsäure kalt und der Eintrag der Reaktionslösung in diese langsam erfolgt, sonst ist eine erheblich reduzierte Ausbeute die Folge.

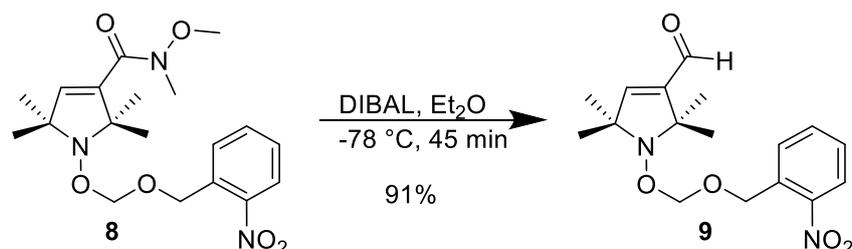


Abbildung 45: Synthese des geschützten Aldehyds **9**.

In einer darauffolgenden Seyferth–Gilbert–Homologisierung mit dem Ohira–Bestmann Reagenz, welches die Umsetzung von Aldehyden zu Alkinen unter milden Bedingungen ermöglicht, wurde der geschützte Aldehyd **9** in das entsprechende Alkin **2** überführt (siehe Abbildung 46). Mechanistisch erfolgt zunächst eine Deacetylierung des Reagenzes durch das *in situ* generierte Methoxid. Durch Addition des Carbanions an den Aldehyden, kann das entstehende Alkoxid sich unter Bildung eines Oxaphosphetans an den Phosphor addieren. Analog zur Wittig–Reaktion kann nun eine Cycloeliminiierung hin zum Diazoalken geschehen. Durch Eliminierung von Stickstoff bildet sich ein Carben, welches in einer 1,2–Umlagerung zum Alkin reagiert. Die erzielten Ausbeuten waren jedoch nur mäßig. Viele Reaktionsvorschriften sehen den Einsatz von zwei Äquivalenten des Ohira–Bestmann Reagenzes vor. Dies führte aber in dem Fall zu einer Ausbeute zwischen 25 und 30 Prozent. Dies konnte durch eine Erhöhung um 1.5 Äquivalente auf 46% gesteigert werden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob diese auf einmal oder in mehreren Chargen zugegeben wurden. Auch erbrachte eine weitere Erhöhung des Reagenzes keine zusätzliche Steigerung der Ausbeute.

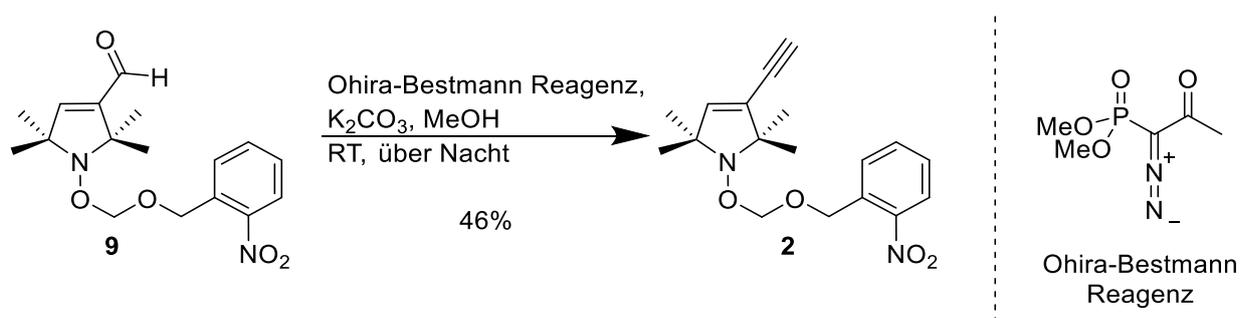


Abbildung 46: Synthese von Alkin **2** über eine Seyfert–Gilbert–Homologisierung.

Alternativ wurde Verbindung **2** über eine Peterson–Olefinierung mit Trimethylsilyldiazomethan hergestellt (siehe Abbildung 47). Die Generierung des benötigten Diazoalkens erfolgt hierbei über Addition des Anions des Trimethylsilyldiazomethan an den Aldehyden mit anschließender Übertragung der TMS–Gruppe an das Alkoxid. Durch Eliminierung des silylierten Sauerstoffes gelangt man zum Diazoalken, welches über Stickstoffabspaltung und 1,2–Umlagerung zum Alkin reagiert.

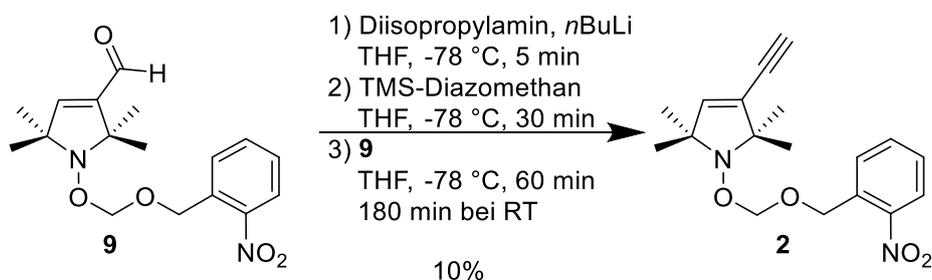


Abbildung 47: Synthese von Alkin **2** über eine Peterson–Olefinierung.

Mit 10% Ausbeute ist die Olefinierung jedoch noch einmal deutlich schlechter als die Homologisierung. Ursächlich für die schlechten Ergebnisse der beiden Reaktionen könnte eine 1,3-dipolare Cycloaddition sein, die als Konkurrenzreaktion zur Bildung des Diazoalkens abläuft (siehe Abbildung 48). Als weiterer Reaktionsverlauf scheint eine Hydrolyse oder eine Wolf–Kishner-artige Reaktion denkbar. Ahmad, Gupta *et al.* beschrieben die Bildung von funktionalisierten Pyrazolen durch Reaktion von α,β -ungesättigten Aldehyden mit dem Ohira–Bestmann Reagenz.²⁵² In Ermangelung eines α -Protons zum Aldehyd ist die Bildung eines Pyrazols hier nicht möglich. Diese Spezies konnten jedoch weder nach der Aufarbeitung noch aus der Reaktionslösung nachgewiesen werden. Indizien für eine signifikante Beteiligung dieser Nebenreaktion, könnte der Einsatz eines gesättigten TPA-Aldehyden in der gleichen Reaktion liefern. Dieses Experiment wurde an dieser Stelle aber nicht durchgeführt.

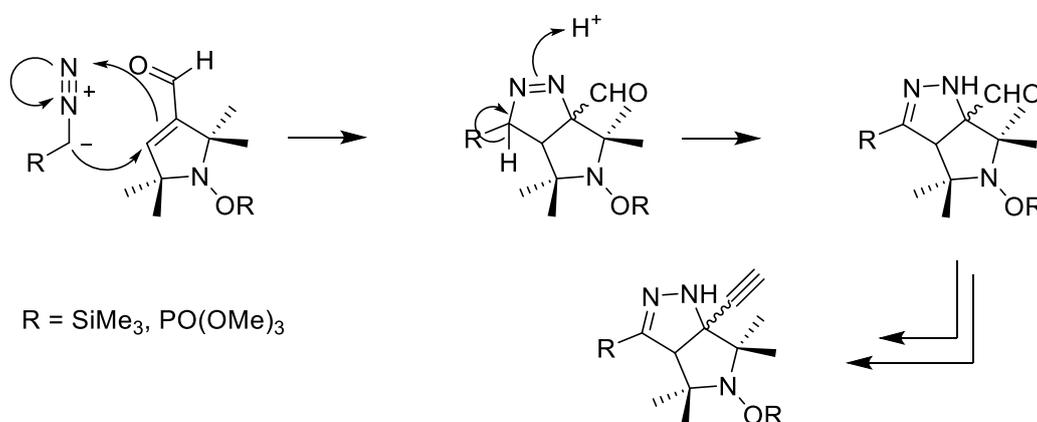


Abbildung 48: 1,3-dipolare Cycloaddition als mögliche Nebenreaktion bei der Alkinyntese basierend auf einer Arbeit von Ahmad und Gupta.²⁵²

Wegen der nicht zufriedenstellenden Ausbeuten des letzten Schrittes, wurden Alternativen dafür gesucht. Eine erste Alternative publizierten Schiemann *et al.*²⁵³, ausgehend von 2,2,5,5-Tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carbaldehyd (**20**) wird das entsprechende Chlorethenyl **21** in einer Wittig-Reaktion hergestellt. Durch eine basenvermittelte Eliminierung von HCl wird nun Verbindung **21** in Alkin **22** überführt (siehe Abbildung 49). Mit 50% über beide Schritte liegt diese Variante nur leicht vor der Ohira–Bestmann Reaktion bei deutlich höherem zeitlichem Aufwand.

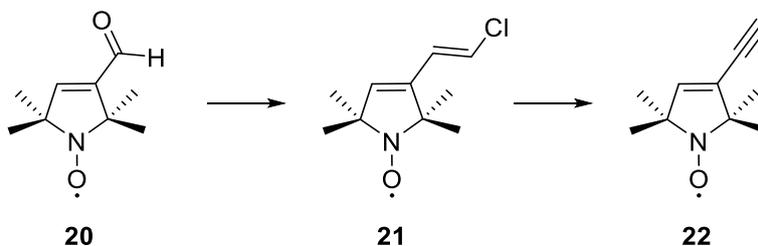


Abbildung 49: Alternative Synthese für die Alkinyntese ausgehend vom entsprechenden Aldehyd.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung des Alkins stellt die Überführung des Carbaldehyden **20** über eine Corey–Fuchs Reaktion dar (siehe Abbildung 50).

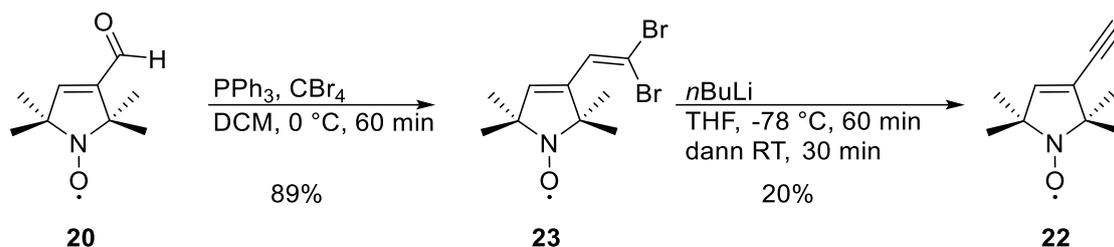


Abbildung 50: Alternative Synthese für die Alkinfunktionalität ausgehend vom entsprechenden Aldehyd über eine Corey–Fuchs Reaktion.

Die Darstellung des Dibromolefins **23** über eine Wittig–Reaktion verlief problemlos und in ausgezeichneten Ausbeuten. Der Flaschenhals dieser Syntheseroute stellt der Halogen–Metall–Austausch mit anschließender Umlagerung zum Alkin dar. Zu Beginn zeigt die Reaktionslösung die charakteristische Gelbfärbung eines Nitroxidradikals, welche auch nach der Zugabe von *n*BuLi weiterbesteht, sofern die Temperatur bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten wird, aber sobald die Temperatur auf Raumtemperatur gebracht wird, um Eliminierung und Umlagerung zu begünstigen, nimmt die Gelbfärbung deutlich ab. Auf die Variante das Alkin ausgehend von Verbindung **9** aufzubauen wurde verzichtet, da bekannt ist, dass Nitroverbindungen bei Umsetzung mit sehr starken nukleophilen Basen Additionsprodukte bilden. Alternativ könnte statt des Nitroxidradikals das freie Amin eingesetzt werden. Hierbei besteht die Gefahr, dass das Alkin sich bei der nachträglichen Oxidation und Schützung zersetzt. Erste Versuche Verbindung **22** in Verbindung **2** umzusetzen, gelangen nicht, weshalb die bestehende Syntheseroute beibehalten worden ist.

Darstellung des iodierten Zuckerbausteins 3. Der zweite Baustein der Synthese beginnt mit der Umsetzung von kommerziell erhältlichem Uridin (**10**) mit Essigsäureanhydrid zum Triacetyluridin **11** (siehe Abbildung 51). Die Acetylierung der drei OH–Gruppen erleichtert im Allgemeinen den Umgang und erhöht die Ausbeute der anschließenden Iodierung. Die direkte Iodierung von Uridin ist ebenfalls möglich^{254–256}, hat aber nie sonderlich gut funktioniert und die Reinigung erwies sich als umständlich und zeitraubend. Die anschließende Iodierung mit Iod und Ammoniumcernitrat funktionierte in ausgezeichneten Ausbeuten und verlief problemlos gemäß Asakura *et al.*²⁵⁷ (siehe Abbildung 51).

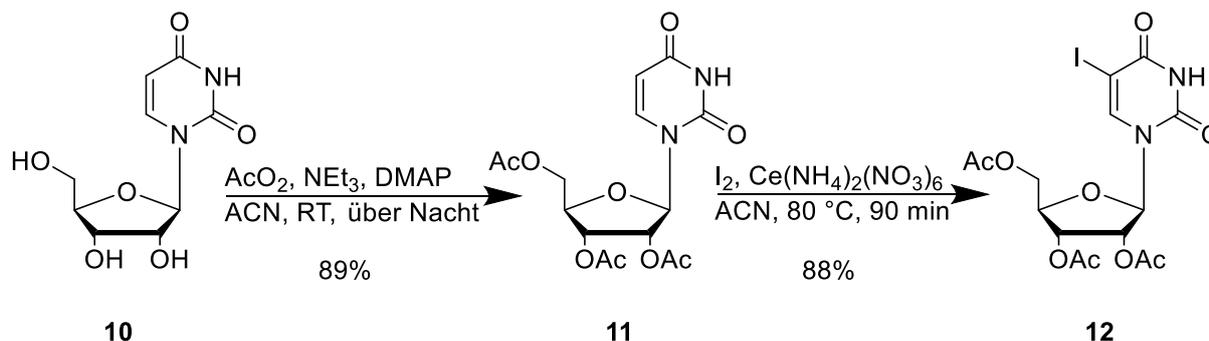


Abbildung 51: Synthese von 5′-iodiertem Triacetyluridin **12** ausgehend von Uridin (**10**).

Die nächsten Schritte sahen zunächst das Entfernen der Acetylenschutzgruppen mit Natriummethanolat vor, unter Bildung von 5'-Ioduridin (**13**), sowie die anschließende Schützung der primären 5'-OH-Gruppe mit DMTr zu Verbindung **14** (siehe Abbildung 52). Da die primäre 5'-Position aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs deutlich reaktiver als die sekundären 2'- und 3'-Positionen ist, muss diese vor dem Einbringen der 2'-Schutzgruppe mit DMTr geschützt werden. Ansonst bekommt man zu großen Teilen die 5'-Substitution. Wegen der schieren Größe der DMTr-Gruppe, kann nur die primäre OH-Gruppe, wegen der besseren Zugänglichkeit, in dieser Reaktion umgesetzt werden. Beide Reaktionen verliefen problemlos und konnten in sehr guten bis ausgezeichneten Ausbeuten realisiert werden (siehe Abbildung 52).

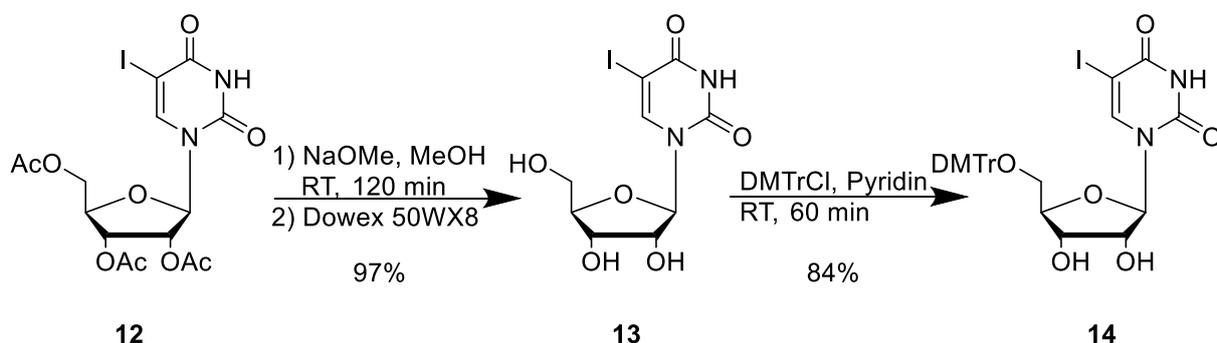


Abbildung 52: Synthese von Verbindung **14** aus acetyliertem 5'-Ioduridin **12**.

Der letzte Schritt vor dem Zusammenfügen der beiden Bausteine mittels Sonogashirakupplung ist das Anbringen der TOM-Schutzgruppe in 2'-Position. Zunächst wurde Verbindung **14** mit Dibutylzinn-dichlorid unter Bildung eines zyklischen 2',3'-O-Dibutylstannyls umgesetzt. Dies in Kombination mit 1,2-Dichlorethan als Lösungsmittel und einer Reaktionstemperatur von 80 °C sorgt gemäß Pitsch *et al.*²²⁷ zu einer überwiegenden 2'-Alkylierung des Zuckers, wohingegen abweichende Lösungsmittel und Temperaturen zum Großteil in einer 3'-Alkylierung resultieren (siehe Abbildung 53). Die Reaktion

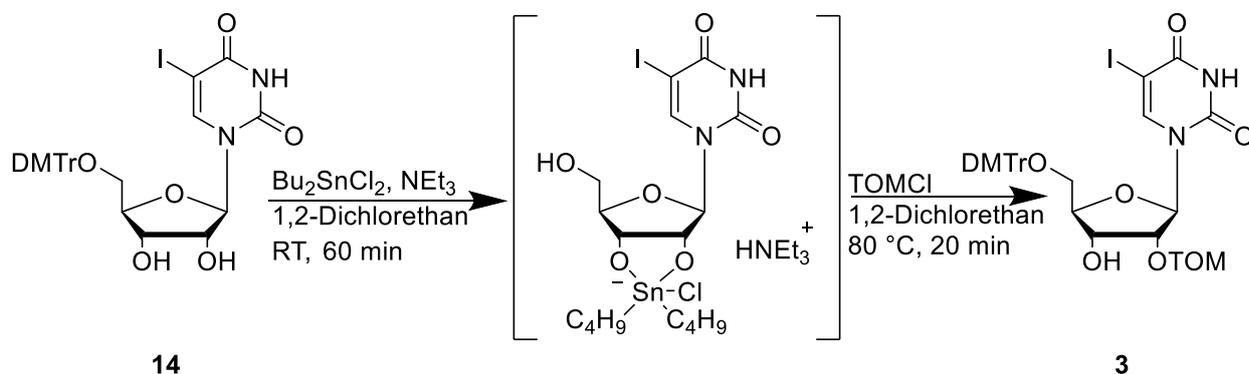


Abbildung 53: Geplante Synthese des 2'-geschützten TOM-Bausteins **13**.

hat auch wie geplant funktioniert, jedoch ließen sich die beiden Regioisomere nicht chromatographisch trennen. Die Möglichkeit einer späteren Einführung des Iods in die 5-Position am Uridin wurde indes nicht verfolgt, da während der Iodierung die DMTr-Gruppe ebenfalls mit dem

intermediär gebildeten Iodkation reagieren würde. Zumal nicht klar war, ob die TOM-Gruppe die Reaktionsbedingungen überstände. Außerdem können durch eine Substitution der Schutzgruppe die äußerst gesundheitsschädlichen Stannane vermieden werden, was schließlich in der Entscheidung mündete TOM als Schutzgruppe zu verwerfen.

Darstellung des iodierten Zuckerbausteins 27. Als Ersatz wurde die von Ohgi et al.²⁵⁸ entwickelte CEM-Gruppe gewählt, welche ebenfalls exzellente Kupplungsausbeuten in der Festphasensynthese liefert. Leider kann diese nur mit wasserfreiem TBAF wahlweise in DMSO oder THF entfernt werden. Aus vorangehenden Arbeiten im AK Göbel war jedoch bekannt, dass die photolabile Schutzgruppe des Radikals TBAF-Entschützungen ohne Zersetzung übersteht. Die neue Synthese des Zuckerbausteins, ausgehend von 5-Ioduridin (**13**), ist in Abbildung 54 gezeigt.

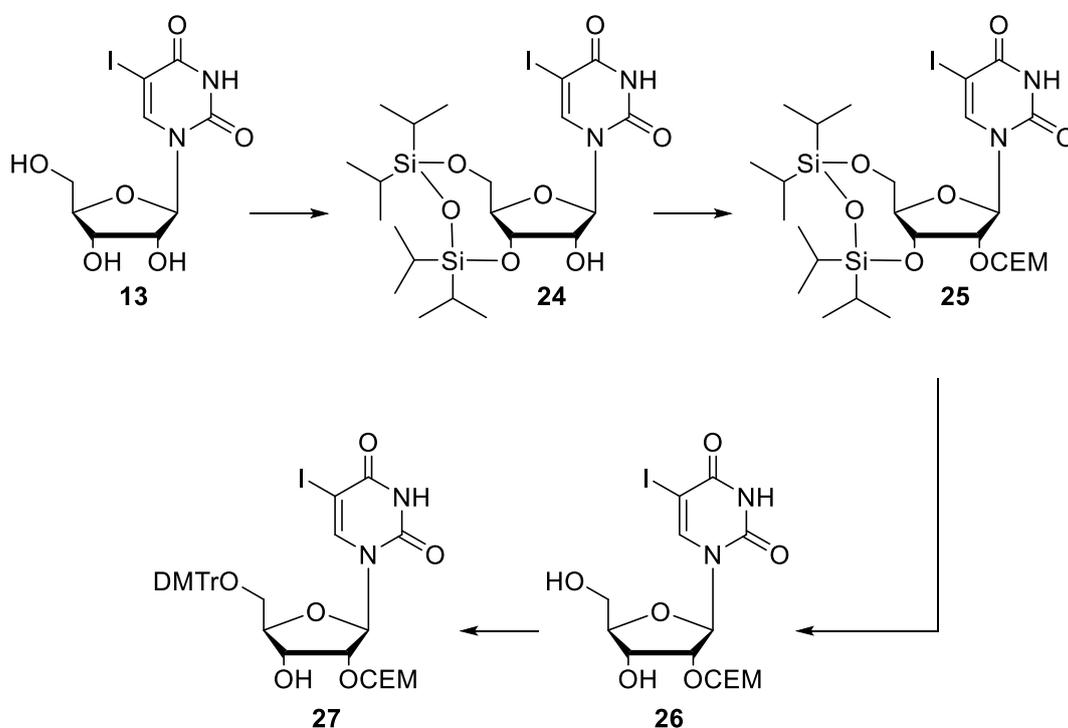


Abbildung 54: Syntheseroute zur Darstellung des CEM-geschützten Zuckerbausteins **27**.

Zunächst wurde 5-Ioduridin (**13**) mit einer Markiewicz-Gruppe (TIPDS) an 5'- und 3'-Position geschützt. Diese Reaktion läuft selektiv für die 5'-3'-Verknüpfung ab, da aufgrund der höheren Reaktivität der 5'-Position diese zuerst reagiert und die 3'-Position in räumlicher Nähe dazu liegt. Die Bildung von mittelgroßen Ringen scheint aufgrund der extremen Oxophilie des Siliciums oder einer räumlichen Präorganisation nicht gehemmt, da die Reaktion in guten Ausbeuten realisiert werden konnte und das Produkt problemlos zu isolieren war. Durch die festgelegte Konnektivität hat man beim Einführen der CEM-Schutzgruppe auch nicht das Problem von späteren Regioisomeren, da nur die 2'-OH-Gruppe freiliegt (siehe Abbildung 55).

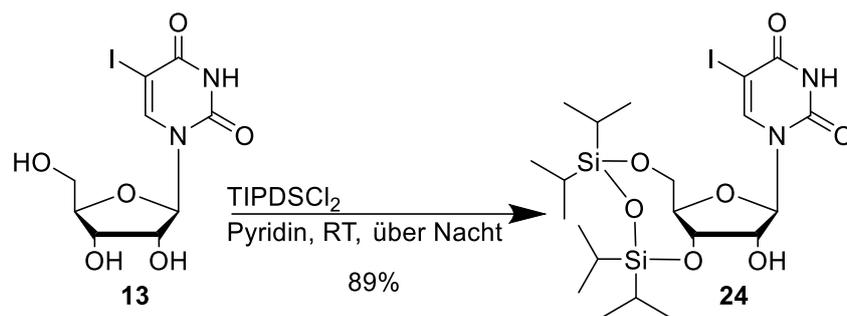


Abbildung 55: Synthese von Verbindung **24**.

Als nächstes wurde die CEM-Gruppe an die einzig freie OH-Gruppe gekuppelt (siehe Abbildung 56). Die Reaktion konnte gemäß Shiba *et al.*²⁵⁹ problemlos durchgeführt werden. Der hierfür eingesetzte 2-(Cyanoethyl)methylthiomethylether (**28**) muss zunächst *insitu* mit Iodsuccinimid iodiert werden, um anschließend mit der OH-Gruppe substituiert werden zu können. Der erste Schritt der Aktivierung bildet vermutlich, wie in analogen Fällen auch, die Bildung eines Iodsulfoniumionkations mit einem Succinimidylanion als Partner. In einer Substitution ersetzt das Succinimidylanion das Iod unter Bildung eines Succinimidydsulfoniumions. Dieses zerfällt wiederum und bildet unter anderem ein mesomeriestabilisiertes Carbokation an welches sich das Iodid anlagern kann (siehe Abbildung 56).²⁶⁰

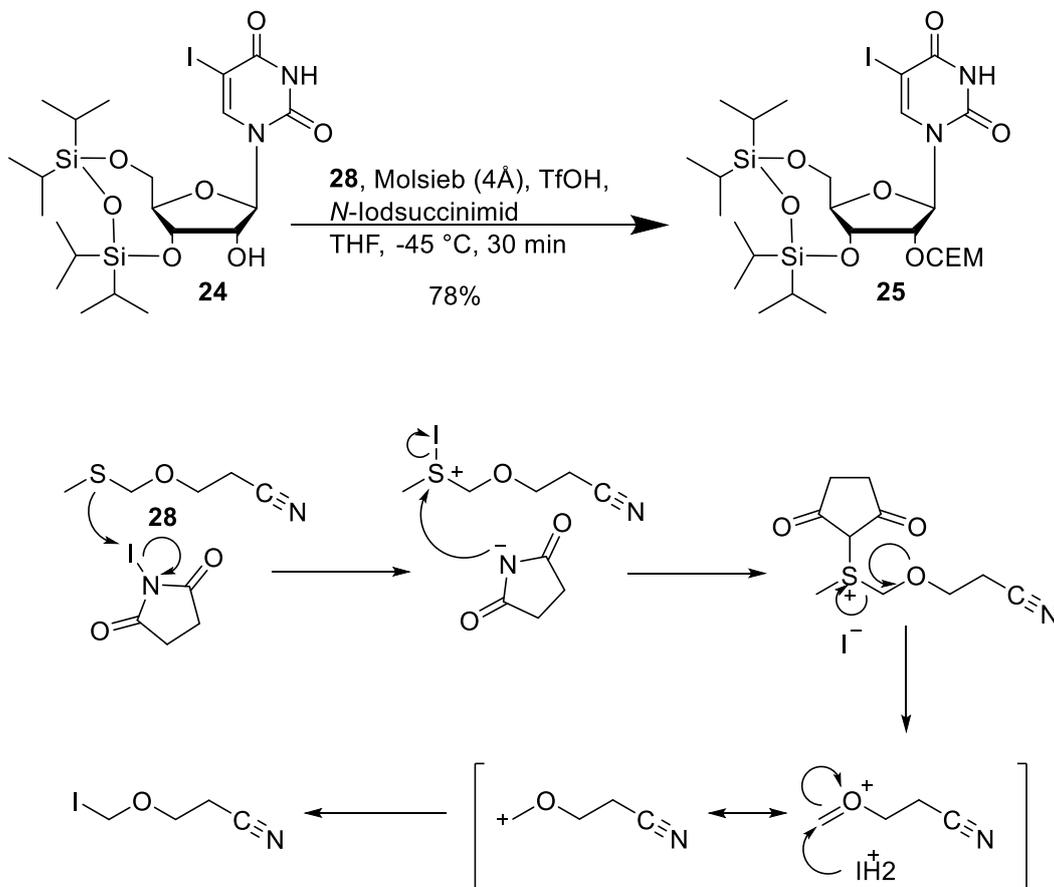


Abbildung 56: Schützung von Verbindung **24** mit einer CEM-Gruppe in 2'-Position, sowie die Generierung der aktiven Spezies, welche von der freien OH-Gruppe in einer Substitutionsreaktion angegriffen werden kann.²⁶⁰

Denkbar wäre auch die *in situ* Aktivierung von Verbindung **28** auf die Aktivierung des Thiomethylethers **18** zu übertragen. Dies würde das als kritische geltende SO_2Cl_2 als Reagenz vermeiden und die Ausbeute der Radikalschätzung möglicherweise signifikant erhöhen. Jedoch würde dann keine Aufarbeitung stattfinden, was zu weiteren Nebenreaktionen führen könnte.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe von Ammoniumfluorid die Markiewicz-Gruppe entfernt und so zu Verbindung **26** umgesetzt. Anschließend erfolgte die Schätzung der freien 5'-OH-Gruppe mit DMTr zu Verbindung **27** (siehe Abbildung 57). Beide Reaktionen verliefen problemlos und konnten in sehr guten bis ausgezeichneten Ausbeuten realisiert werden.

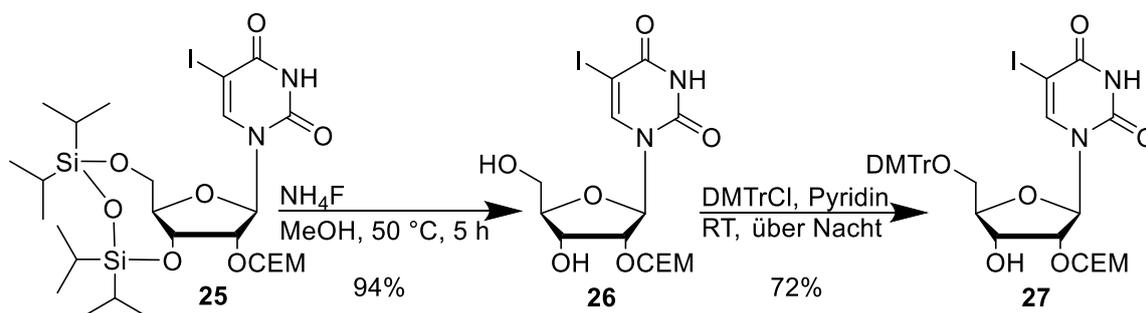


Abbildung 57: Synthese von Verbindung **27**.

Darstellung des CEM-geschützten Phosphoramidits **31.** Die folgende Sonogashirakupplung, welche die Bausteine **2** und **27** zu Verbindung **29** verknüpfen soll, sowie die anschließende Phosphitylierung zum Amiditbaustein **31** funktionierten in guten Ausbeuten und das Produkt ließ sich jeweils problemlos isolieren (siehe Abbildung 58). Da die einzelnen Diastereomere des Amidits nicht getrennt wurden, weisen die Spektren einen doppelten Signalsatz auf.

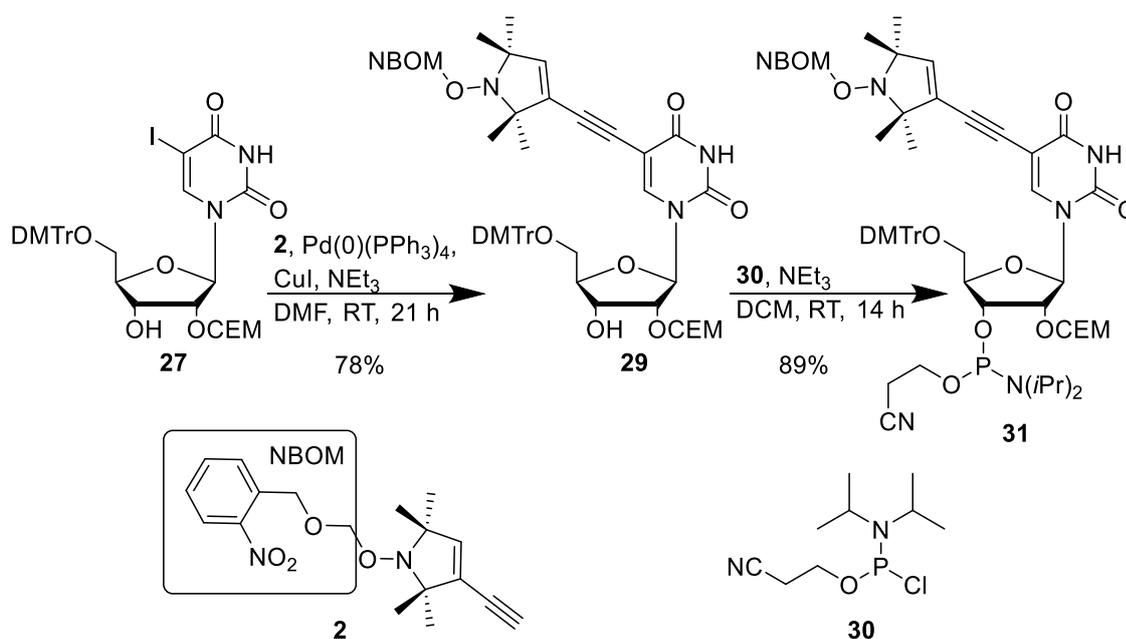


Abbildung 58: Synthese des uridin-basierten Amiditbausteins **31**.

Mittels Festphasensynthese wurde das Phosphoramidit **31** nun in eine palindromische Sequenz (siehe Tabelle 2) eingebaut. Für erste Testsynthesen bietet dies den Vorteil, dass nur ein Einbau des Sonderamidits pro Strang erforderlich ist, um eine PELDOR-Messung durchführen zu können, da palindromische Sequenzen selbstkomplementär sind. Jedoch können Palindrome neben der Duplexstruktur auch Haarnadel-Motive bilden, und um dem entgegenzuwirken, wurde in der Mitte der Sequenz eine CCGG-Einheit platziert. Rechnungen mittels NUPACK²⁶¹ ermittelten den Doppelstrang als Energieminimum der freien Enthalpie für die RNA-Sequenz **I** (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Synthetisierte palindromische RNA-Sequenz I.

RNA	Sequenz	Modifikation
I	5'-CGGAUGACCGGUCA ^X CCG-3'	X = geschützter Spinlabel

Die genauen Informationen zu verwendeten Geräten, Chemikalien und Abspaltbedingungen vom Träger sind in Abschnitt 4.3 beschrieben. Durch das Abspalten des Oligos vom Trägermaterial mit einem Ammoniak/Ethanol-Gemisch, wurden gleichzeitig auch alle anderen Schutzgruppen mit Ausnahme der CEM-Gruppe entfernt. Nach dem anschließenden Trocknen wurde das Oligo mit 0.5 M TBAF in DMSO und 0.5% Nitromethan gelöst und für fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.²⁵⁹ Die zuvor farblose Flüssigkeit hat sich nach der Inkubation bräunlich verfärbt. Eine anschließende Trennung mit der HPLC unter Ionenaustauschbedingungen ergibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Signalen aber keine Hauptfraktion. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 59 gezeigt.

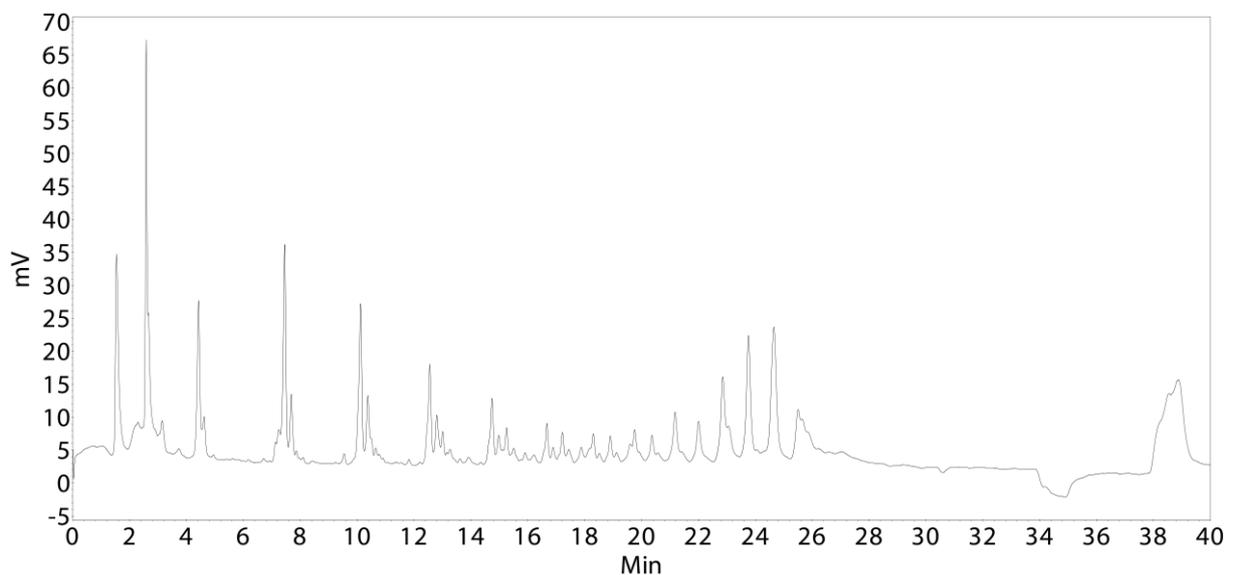


Abbildung 59: AE-Chromatogramm von RNA I nach der Entschützung der CEM-Gruppe mit TBAF in DMSO und Nitromethan. A: DEPC-Wasser, B: 1 M LiCl; Gradient: 0 – 56% B binnen 32 min; Flussrate: 5 mL/min.

Die breite Verteilung an unterschiedlich langen Fragmenten könnte daraufhin deuten, dass die eigentliche Synthese nicht funktionierte, obwohl die Kupplungsausbeute dies nicht vermuten ließ. Eine zweite Synthese führte jedoch zu dem gleichen Ergebnis, das HPLC-Chromatogramm zeigte eine

Vielzahl an unterschiedlichen Peaks ohne Hauptsignal. Das Problem konnte demnach nicht die Synthese sein, vielmehr lag der Verdacht nahe, dass das verwendete Amidit **31** nicht mit den Entschützungsbedingungen kompatibel war. Deswegen wurde der Amiditvorläufer **29** und die beiden TPA-Derivate **8** und **2** unter denselben Bedingungen wie das zu entschützende Oligo mit TBAF in DMSO inkubiert. Verbindung **8** zeigte auch nach fünf Stunden ein einheitliches Bild auf der DC, welches sich mittels Massenspektrometrie auch bestätigte. Anders jedoch bei den Verbindungen **2** und **29**. Bereits beim Mischen verfärbte sich die Lösung zunächst dunkelrot und dann schwarz. Nach nur fünf Minuten war von dem Ausgangsmaterial nichts mehr mit der DC nachweisbar. Das Problem stellt demnach nicht die Schutzgruppe des Nitroxids dar, sondern das Mehrbindungssystem, über welche die beiden Bausteine **2** und **27** miteinander verknüpft werden. Die wasserfreie Umgebung macht aus dem Fluorid eine sehr starke Base, die im ersten Schritt der CEM-Entschätzung ein Proton in α -Position zum Nitril abspaltet. Dabei kommt es zur Eliminierung von Acrylnitril und einem Halbacetalanion, welches wiederum in Formaldehyd und den freien Zucker zerfällt (siehe Abbildung 60).

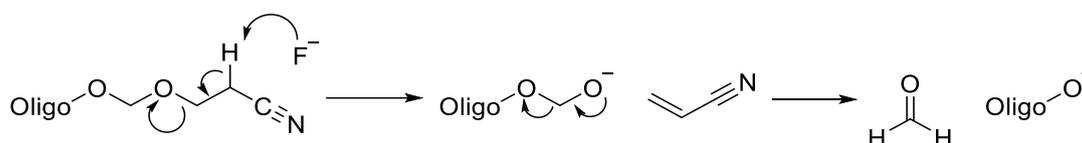


Abbildung 60: Wahrscheinlicher Mechanismus der CEM-Entschätzung mit Fluorid.

Gleichzeitig stellt das Fluorid ein potentes Nukleophil dar, welches sich in diesem Fall wahrscheinlich an das konjugierte Mehrbindungssystem addiert und dort zu unerwünschten Nebenreaktionen führt. An dieser Stelle wurde jedoch versäumt, abseits von Fluorid, weitere Basen, wie Diazabicycloundecan (DBU) oder möglicherweise Natriumhydrid, die nicht nukleophil sind, in der Entschätzung zu versuchen.

Darstellung des iodierten Zuckerbausteins 32. Da nun sowohl TOM als auch CEM nicht die gewünschten Ergebnisse lieferten, war die TBDMS-Gruppe die nächstliegende Lösung. Erneut ausgehend von 5-Ioduridin (**13**), erfolgte die problemlose Tritylierung der 5'-OH-Gruppe zu Verbindung **14**. Anschließend wurde die 2'-OH-Gruppe mit TBDMS geschützt. Die beiden Regioisomere ließen sich an dieser Stelle säulenchromatographisch trennen, so dass Verbindung **32** in ausreichender Reinheit verfügbar war (siehe Abbildung 61). Das 3'-Isomer wurde mit einer Fluoridquelle, meist TBAF, entschützt und erneut in der TBDMS-Schätzung eingesetzt. Die zur Entschätzung der TBDMS-Gruppe notwendigen Reagenzien (NMP, TEA und HF/TEA-Addukt) sind mit dem eingesetzten Baustein kompatibel.

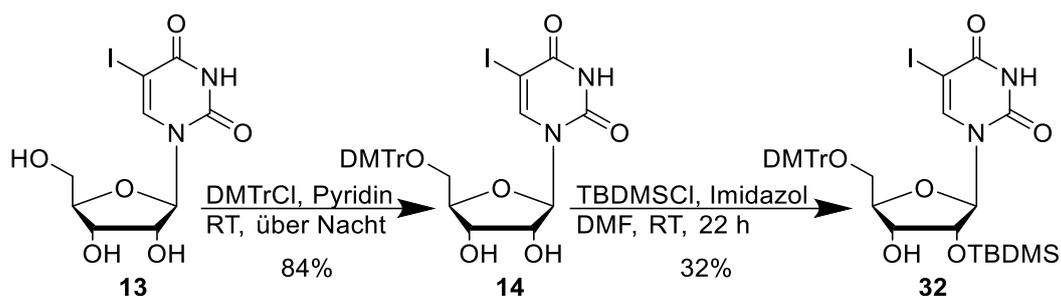


Abbildung 61: Synthese von Verbindung 32.

Darstellung des TBDMS-geschützten Phosphoramidits 34. Analog zu den mit den CEM-geschützten Zuckerbaustein, konnten die beiden Bausteine **2** und **32** mit einer Sonogashira-Kupplung zu Verbindung **33** umgesetzt werden. Die erzielten Ausbeuten sind vergleichbar gut ausgefallen und auch die Isolierung verlief problemlos. Die anschließende Phosphorylierung zu Verbindung **34** lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Umsetzung von **29** zu **31** (siehe Abbildung 62).

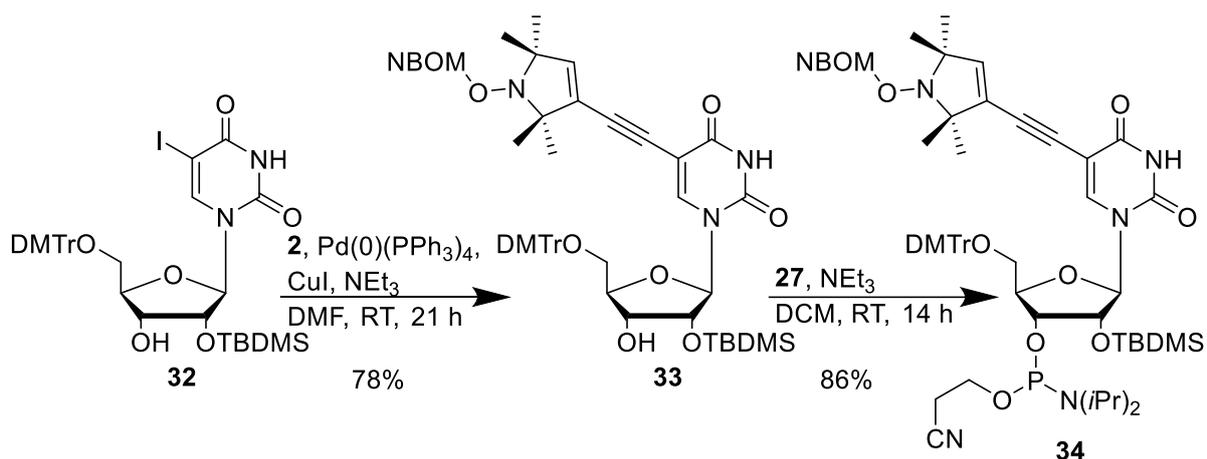


Abbildung 62: Synthese des TBDMS-geschützten Phosphoramidits 34.

3.1.2 Cytidinbaustein

Syntheseplanung. Wie auch der Uridinbaustein **34** setzt sich der Cytidinbaustein **43** aus dem TPA-Alkin **2** und dem entsprechenden TBDMS-geschützten Zuckerbaustein **41** zusammen. Die Verknüpfung der beiden Bausteine soll ebenfalls über eine Sonogashira-Kupplung geschehen. Da bereits im Kapitel über den Uridinbaustein auf das Alkin **2** eingegangen wurde, soll an dieser Stelle nur eine kurze Betrachtung des Cytidinbausteins **41** erfolgen. Wiederum ausgehend von kommerziell erhältlichem Cytidin (**35**) muss zunächst die 5-Position iodiert werden. Anschließend wird das exozyklische Amin als Amidin geschützt, um Nebenreaktionen während der Tritylierung und TBDMS-Schätzung zu vermeiden. Die Syntheseroute ist in Abbildung 63 gezeigt.

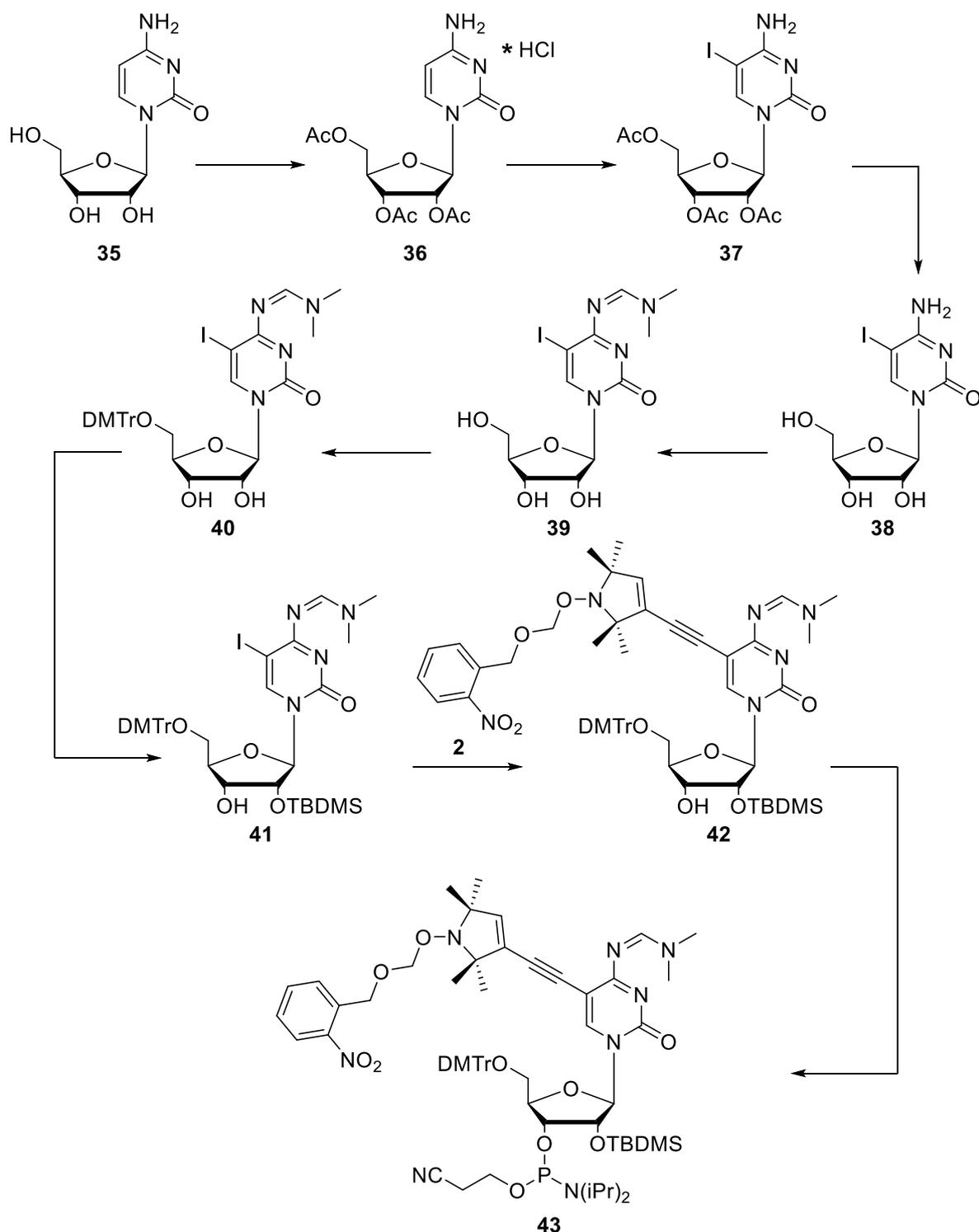


Abbildung 63: Syntheseroute für das cytidin-basierte Phosphoramidit **43**.

Darstellung des iodierten Zuckerbausteins 41. Ausgehend von Cytidin (**35**) erfolgt zunächst die Acetylierung unter sauren Bedingungen mit Acetylchlorid zum Hydrochlorid **36**. Die eingesetzte Essigsäure verhindert durch Protonierung des Ringstickstoffs die Acetylierung der exozyklischen Aminogruppe. Das entstehende Salz lässt sich leicht aus Ethanol und in sehr guten Ausbeuten umkristallisieren. Die anschließende Iodierung zu Verbindung **37** erfolgte gemäß Piton *et al.* in Essigsäure mit Iodsäure und Iod aber ohne Tetrachlorkohlenstoff. Dieser wurde aus Kostengründen

und Umweltaspekten nicht verwendet.²³² Die direkte Iodierung unter denselben Bedingungen, hat immer nur schlecht funktioniert und war schwierig aufzuarbeiten, weshalb der Umweg über die Acetylierung gewählt worden ist (siehe Abbildung 64). Nach der Iodierung muss außerdem beachtet werden, dass direkte Sonneneinstrahlung zu einer raschen Zersetzung führt. Nichts desto trotz konnte die Iodierung in guten Ausbeuten realisiert werden.

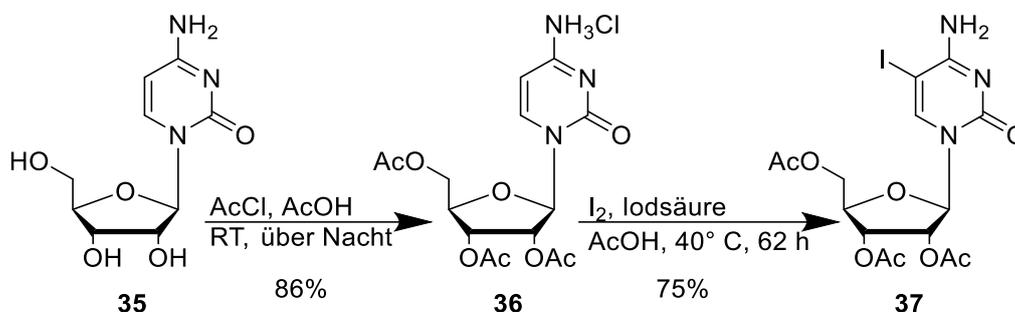


Abbildung 64: Synthese von Verbindung **37**.

Anschließend wurden die Acetylgruppen mit Natriummethanolat entfernt und so Verbindung **37** in **38** überführt. Die hohe Reaktivität der exozyklischen Aminogruppe in Substitutionsreaktionen ist bei der späteren Funktionalisierung der drei OH-Gruppen hinderlich, weswegen diese mit DMF-DMA als Amidin geschützt wurde. Die Reaktion ist auch in Gegenwart von Hydroxygruppen selektiv für die Bildung des Amidins. Verbindung **39** konnte in guten Ausbeuten isoliert werden. Da Amidine jedoch hydrolyseempfindlich sind, führt eine lange Lagerung bei hohen Temperaturen in protischen und polaren Lösungsmittel wie Methanol zur langsamen Zersetzung. Während der säulenchromatographischen Reinigungen mit Methanol muss deswegen auf Schnelligkeit und verringerte Temperaturen beim Entfernen des Lösungsmittels geachtet werden, da ansonst das Edukt wieder in signifikanter Menge entstünde.

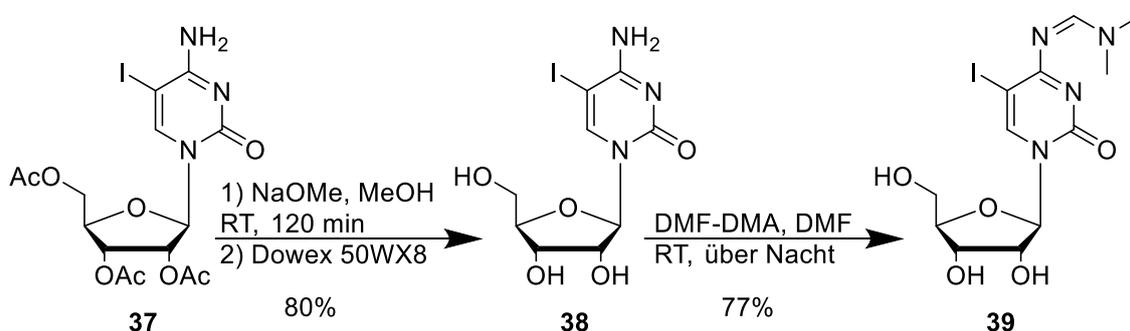


Abbildung 65: Synthese von Verbindung **39**.

Die Überführung von Verbindung **39** in ihr DMTr-geschütztes Pendant **40** und die Folgereaktion, in welcher die TBDMS-Gruppe in 2'-Position eingeführt wird und so Verbindung **40** in **41** überführt wird, erfolgten unter denselben Reaktionsbedingungen, die auch für das Uridinderivat verwendet worden sind (siehe Abbildung 66).

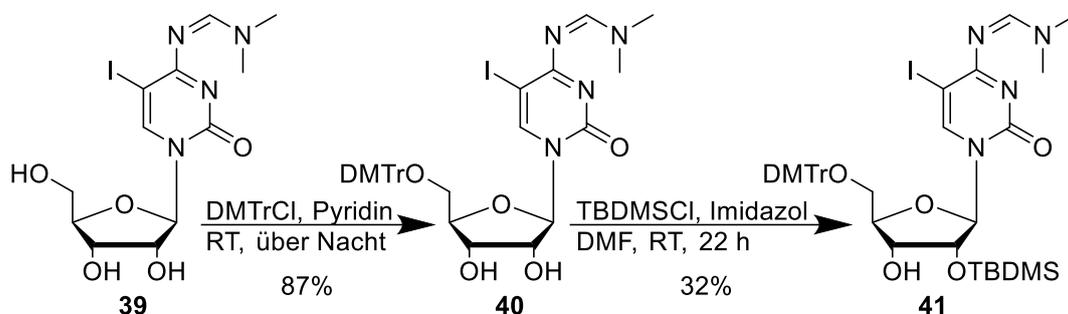


Abbildung 66: Synthese von Verbindung **41**.

Darstellung des TBDMS-geschützten Phosphoramidits **43.** Abschließend wurden die beiden Bausteine **41** und **2** in einer weiteren Sonogashira-Kupplung miteinander zu Verbindung **42** verknüpft, welche weiter zum Phosphoramidit **43** umgesetzt wurde. Beide Reaktionen verliefen analog zu denen der Uridinderivate **33** und **34** mit vergleichbaren Ausbeuten.

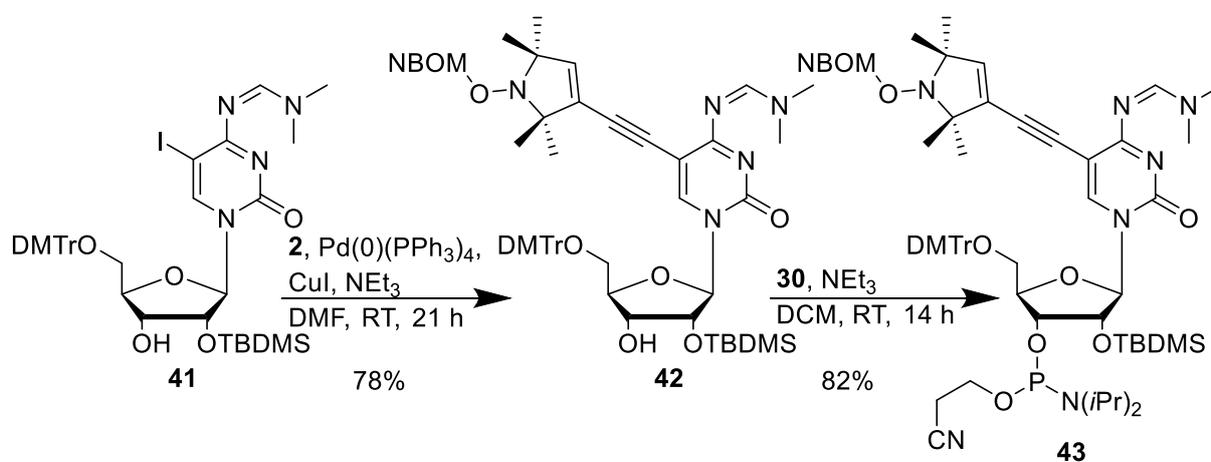


Abbildung 67: Synthese des TBDMS-geschützten Phosphoramidits **43**.

3.1.3 Einbau des Uridinbausteins 31 in verschiedene RNAs

Wie auch beim CEM–Amidit, wurde das TBDMS–Amidit für einen Test in das palindromische 18mer eingebaut und charakterisiert. Zu Vergleichszwecken diente die unmodifizierte Variante (siehe Abbildung 68). Die Synthese erfolgte analog zum ersten Versuch an CPG mit 2'–TBDMS–geschützten Amiditen. Das Sonderamidit kuppelte erwartungsgemäß schlechter als die kommerziell bezogenen Amidite aber immer noch mit guten Ausbeuten. Auch Abspaltung vom Träger mit anschließender Reinigung und Entfernung aller Schutzgruppen verliefen diesmal problemlos und die geschützte RNA I ließ sich isolieren (siehe Abbildung 124). Die NBOM–Schutzgruppe erwies sich in all diesen Schritten als stabil und es konnte keine Degradierung festgestellt werden. Durch Bestrahlung der RNA in einem

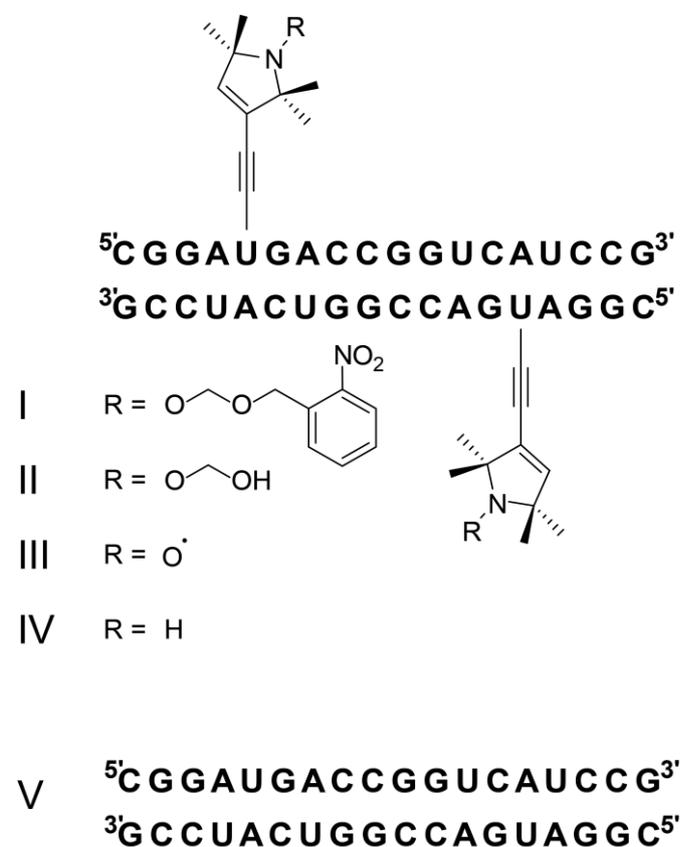


Abbildung 68: Strukturen der palindromischen RNAs I – V. RNA I repräsentiert den Zustand nach der vollständigen Reinigung der RNA, der TPA–Label ist noch mit 2–NBOM–Gruppe geschützt. Durch Bestrahlung wird das Halbacetal II erzeugt, welches durch Erhitzen Formaldehyd abspaltet. Autoxidation an Luft führt zur Bildung von RNA III. Die Bildung von IV, einem möglichen Nebenprodukt der Bestrahlung, konnte nicht in signifikanten Mengen detektiert werden. Die gekaufte RNA V dient dem späteren Vergleich zwischen markierter und unmarkierter RNA.

Phosphatpuffer kann die NBOM–Gruppe bei einer Wellenlänge von 365 nm abgespalten werden. Anders als beim TEMPO–Label, bestand bei dem TPA–Label die Hoffnung, dass durch die kleinere Ringgröße, was mit einer zusätzlichen sterischen Belastung am Nitroxid einhergeht, das Halbacetal II destabilisiert und die Eliminierung von Formaldehyd wahrscheinlicher würde. cw–Messungen bei unterschiedlichen pH–Werten und variierenden Zeiträumen zwischen Bestrahlung und Messung scheinen diese Vermutung zu bestätigen (siehe Tabelle 3).

Das Erhitzen der Proben nach dem Bestrahlen änderte die Messergebnisse nur im Rahmen des Fehlers, sofern man diese lang genug bei RT lagerte. Dies wäre vor allem dort von Wichtigkeit, wo biologische Proben nicht erhitzt werden dürfen. Mittels HPLC ließ sich ebenfalls zeigen, dass mit wachsendem zeitlichem Abstand zwischen

Bestrahlung und HPLC–Lauf die Menge an mutmaßlichem Halbacetal abnimmt (siehe Abbildung 69). Das Halbacetal lässt sich in der Masse leider nicht direkt feststellen, da es unter den vorherrschenden Bedingungen sofort zerfällt und nur das Radikal zu detektieren ist. Die Menge an entstehendem

Halbacetal variiert stark von Experiment zu Experiment und auch die Geschwindigkeit, mit welcher der Formaldehyd bei RT eliminiert wird, variiert. Verbindung **8** zeigte beispielsweise bei einem niedrigem pH-Wert keinen Unterschied zwischen erhitzter und nicht erhitzter Probe jedoch bei einem hohen pH-Wert. Das Erhitzen ist normalerweise erforderlich, um das Halbacetal (siehe RNA II) zu eliminieren. Man könnte vermuten, dass die Eliminierung bei niedrigen pH schneller ablaufen würde. Dafür ist das Phänomen jedoch nicht ausreichend genug untersucht.

Tabelle 3: cw-Messungen des Palindroms sowohl direkt nach der Entschützung als auch mit einem Abstand von zwei Stunden bei unterschiedlichen pH-Werten [4.2, 7.4, 8.5]. Bei den Proben handelte es sich um zwei unterschiedliche Bestrahlungen aus derselben Charge und identischer Vorgehensweise (siehe Abschnitt 4.4). Der Wert in Klammern gibt die ermittelte Spinkonzentration nach dem Erhitzen an.

	Messung direkt nach Bestrahlung [μM]			Messung nach zwei Stunden [μM]		
Palindrom	61 (109)	22 (120)	–	208 (184)	159 (157)	131 (138)
8	183 (178)	149 (167)	90 (138)			

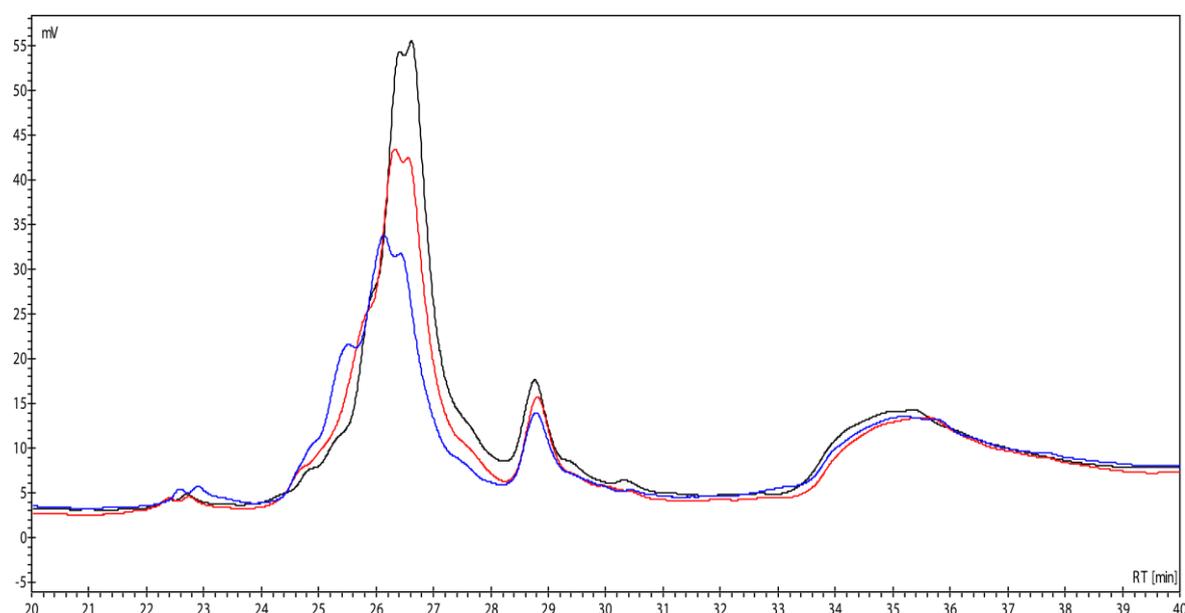


Abbildung 69: Overlay dreier HPLC-Chromatogramme derselben Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung (Blau: 10 min; Rot: 70 min; Schwarz: 190 min). Das Halbacetal (linke Schulter) nimmt mit der Zeit ab und das Radikal nimmt im gleichen Maße an Intensität zu. In der Masse ist stets die Masse des Radikals von 5906 g/mol zu sehen. HPLC-Bedingungen: A: HFIP/TEA (400 mM HFIP, 16.2 mM TEA, pH = 7.8), B: Methanol; Gradient: 5 – 65% B binnen 48 min; Flussrate: 4 mL/min; Temperatur: 25 °C.

Wegen dieser Unsicherheiten wurde ein analoges Vorgehen zu den TEMPO-Derivaten gewählt und die Proben vor den Messungen für 70 min auf 90 °C erhitzt.²⁴⁰ Die labile Stickstoff-Sauerstoffbindung ist eine potentielle Schwachstelle und würde zu dem nicht mehr oxidierbaren Nebenprodukt **IV** führen, welches unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.4 Abbildung 125). Wie bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnt, wurde das Palindrom mit dem Ziel designt, dass die Bildung von Hairpins so weit wie möglich unterdrückt wird. Wenn die Konzentration an Hairpinmotiven in der PELDOR-Probe überhandnimmt, kann das Experiment missglücken, da Hairpins nicht mehr an der Abstandsbestimmung teilnehmen können (nur ein Spinlabel pro Hairpin).

Gleichzeitig wird auch die effektive Gesamtkonzentration der Probe dadurch verringert. Ob die Aufteilung zwischen den beiden Sekundärstrukturen den Voraussagen entspricht, wurde mit einem

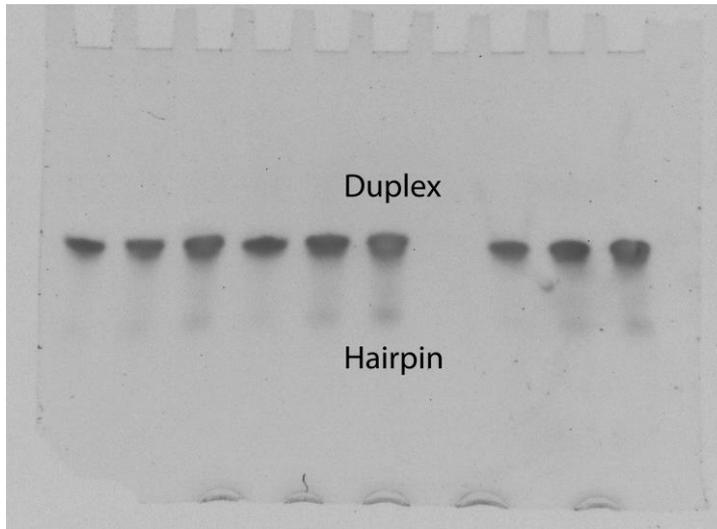


Abbildung 70: Natives Gel der palindromischen RNA III, um die Sekundärstrukturverteilung zwischen Duplex und Hairpin bestimmen zu können.

nativen Gel überprüft. Zu erwarten wären demnach zwei Banden (Hairpin und Duplex), wobei die höher verlaufende Bande, aufgrund des höheren Molekulargewichts, der Duplex sein sollte. Das in Abbildung 70 gezeigte native Gel bestätigt die Erwartungshaltung. Der Hairpin tritt nur in geringem Ausmaß auf. Die sich anschließende PELDOR-Messung belegt nochmals durch eine ausgezeichnete Modulationstiefe (Abbildung 71) die überzeugende

Qualität der Probe, die sich bereits im Gel und der HPLC abzeichnete. Der experimentell ermittelte Abstand zwischen den beiden Labeln von 3.94 nm deckt sich mit den aus molecular modeling (Spartan) stammenden 3.81 nm. Die enge Abstandsverteilung spricht sowohl für ein geringes Ausmaß an unabhängiger Bewegung des Spinlabels als auch für eine einheitliche und stabile Struktur der RNA.

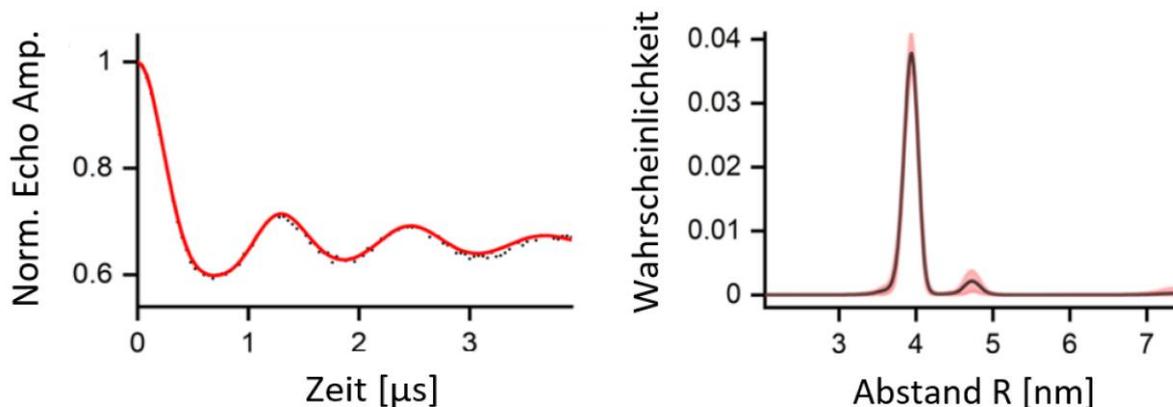
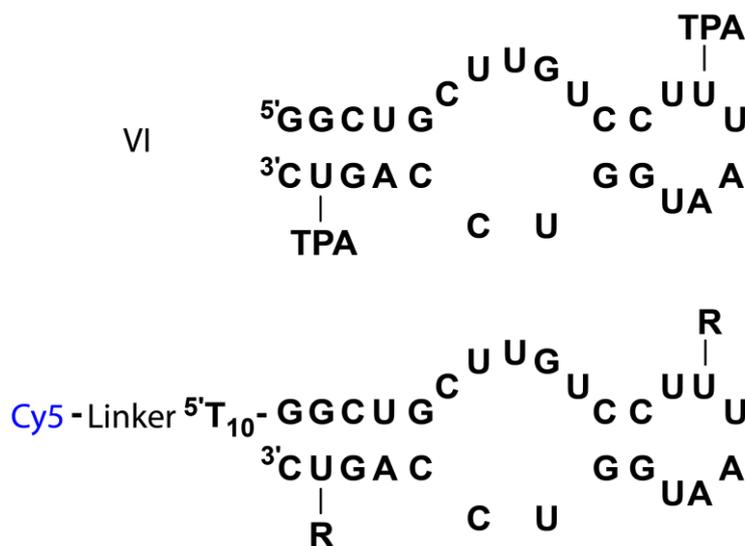


Abbildung 71: PELDOR-Messung von RNA III. **Links:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Rechts:** Abstandsverteilung mit einem Maximum bei 3.94 nm (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). Die vollständigen Messdaten sind in Abschnitt 4.7 gezeigt.

Die Einführung jedes Spinlabels in eine bestehende Sequenz führt zu einer Destabilisierung der Sekundärstruktur. Dies kann je nach Größe und Position der Label Strukturen und Dynamiken der Zielmoleküle stören. Die Messgröße für den Grad der Störung auf globaler Ebene bildet traditionell der Schmelzpunkt (T_m) bzw. die Differenz zwischen dem modifizierten und nicht modifizierten Strang. Für die beiden RNAs III und V ergaben sich T_m -Werte von 79.8 °C bzw. 81.5 °C (siehe Abschnitt 4.8). Beide

Modifikationen destabilisieren den RNA-Strang demnach um lediglich 1.7 °C. Diese Ergebnisse stehen wiederum in Übereinstimmung zu vorausgehenden Arbeiten, die ebenfalls nur eine geringfügige Erniedrigung des Schmelzpunktes beobachteten.^{195,262}

Als weiteres Anwendungsbeispiel des photolabil-geschützten Spinlabel wurde der Neomycin Riboswitch gewählt, dessen Strukturvorschlag aus mapping Daten ohne Neomycin stammt (siehe Abbildung 72).²⁶³ Dieser aus 27 Nukleotiden bestehende Riboswitch gehört zu den kleinsten Aptameren und kann leicht aus Phosphoramiditen synthetisiert werden und gehört gleichzeitig zu einem der intensivsten erforschten Konstrukte, weswegen man auf eine Fülle von Vergleichsdaten zurückgreifen kann. Die EPR-Untersuchung des Neomycin Riboswitch war eine der ersten Anwendungen von PELDOR auf eine tertiär gefaltete funktionelle RNA.²⁶² Die von Kristic *et al.* veröffentlichte Studie verglich mehrere dieser Konstrukte, welche an unterschiedlichen Positionen mit zwei Spinlabel markiert worden ist, mittels PELDOR. Unter den verschiedenen Positionskombinationen ergab das Paar U14/U26 die am besten definierte Abstandsverteilung, aufgrund dessen diese Kombination gewählt worden ist. Wie auch im Fall des Palindroms erfolgte die Synthese von **VI** mittels



- VII R = H, ohne Farbstoff IX R = H, mit Farbstoff
VIII R = TPA, ohne Farbstoff X R = TPA, mit Farbstoff

Abbildung 72: Verschiedene Varianten des Neomycin-Aptamers. Strukturen für Farbstoff und Linker sind in Abbildung 123 gezeigt. Für die EPR-Experimente wurde RNA **VI** nach photochemischer Entschützung zum doppelt spinmarkiertem Derivat **XI** (hier nicht gezeigt) verwendet. Die Cy5-markierten Proben **IX** und **X** sind mittels in-line-probing auf den konformationellen Einfluss der TPA-Label hin untersucht worden und die Strukturen **VII** und **VIII** wurden für Stabilitätstest (Schmelzpunkt) eingesetzt.

Festphasensynthese unter Verwendung TBDMS-geschützter Phosphoramidite. Durch Abspaltung der 2-NBOM-Schutzgruppe mittels einer zwanzigminütigen Bestrahlung bei 365 nm, gefolgt von der Eliminierung des Formaldehyds bei 90 °C, gelang die Isolierung von RNA **VI** (identisch mit der von Kristic *et al.* untersuchten Struktur)²⁶². Die Ergebnisse der PELDOR-Messung ergaben erneut hervorragende Modulationstiefen, die auf ein quantitatives Labeling der Probe hinweisen. Der

ermittelte Abstand von 3.4 nm zwischen den beiden Labeln, stimmt mit den zuvor publizierten Daten genau überein (siehe Abbildung 73).²⁶² Verschiedene PELDOR-Messungen derselben Probe bei sich unterscheidenden Probenvorbereitungen legen den Schluss nahe, dass ein Annealing für Sequenzen,

deren Sekundärstruktur empfindlich gegenüber Temperaturen reagiert, förderlich ist. Der Vergleich zwischen Proben, die von Raumtemperatur direkt mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden und solchen Proben, die zuvor langsam auf 0 °C oder sogar –20 °C heruntergekühlt wurden, zeigt eine schärfere Abstandsverteilung im Falle der bei tiefen Temperaturen annealten Proben (vgl. Abbildungen 132 – 134). Um den Einfluss der TPA-Label auf die Stabilität der Gesamtstruktur einschätzen zu können, wurden erneut Schmelzpunkte gemessen. Kombiniert wurden die Schmelzpunkte mit Strukturdaten aus dem in-line probing, welches lokale Effekte, die durch die Label hervorgerufen werden und andernfalls unbemerkt bzw. falsch eingeschätzt würden, sichtbar macht. Zu diesem Zweck wurden die Derivate **VII** und **VIII** synthetisiert und gereinigt (siehe Abbildung 124). Im Falle von **VIII** erfolgte noch die Freisetzung des Radikals durch Bestrahlung. Beide Aptamere tragen einen zusätzlichen T₁₀-Schwanz und einen Alkinlinker. Der T₁₀-Schwanz ist für das in-line probing unerlässlich, da eine Auflösung der Fragmente nach ihrer Länge erst ab einer gewissen Sequenzlänge, welche etwa zehn Basen beträgt, gelingt. Über den Alkinlinker wird der für das in-line probing notwendige Farbstoff (Cy5) an die RNA (**IX** und **X**) gekuppelt (siehe Abbildung 127).

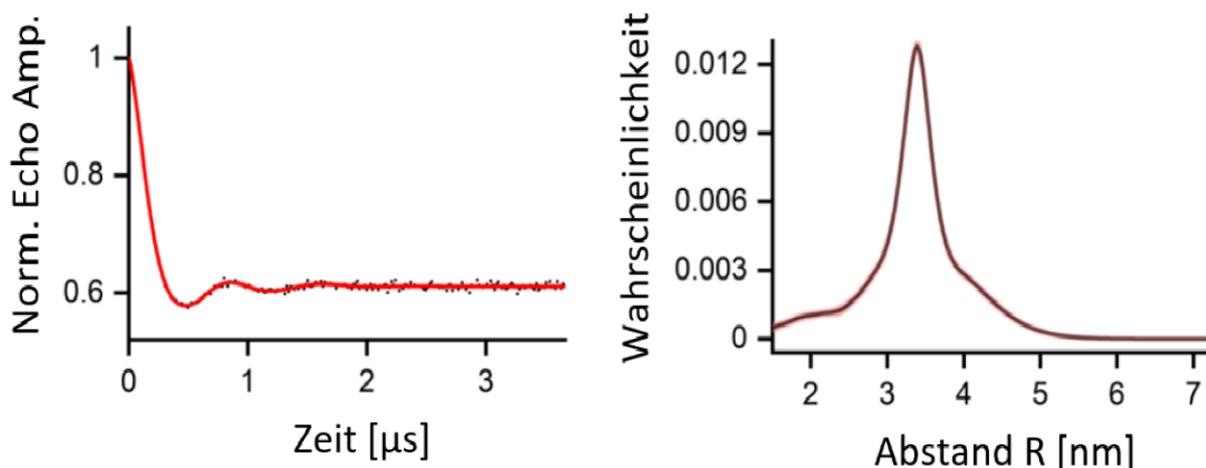


Abbildung 73: PELDOR-Messung von RNA **XI**. **Links:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Rechts:** Abstandsverteilung mit einem Maximum bei 3.4 nm (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). Die Probe wurde bei 0 °C temperiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde. Die vollständigen Messdaten sind in Abschnitt 4.7 gezeigt.

Für RNA **VII** wurde ein T_m von 49.5 °C bestimmt, dies kommt trotz der zusätzlichen Nukleotide für das in-line probing, dem publizierten Wert von 50.5 °C²⁶² für das unmodifizierte Aptamer sehr nahe. Die zwei zusätzlichen TPA-Label in RNA **VIII** senken den T_m um 3.5 °C auf 46.0 °C (48.0 °C für RNA **VI** bei Kristic *et al.*)²⁶². Die Abweichung des gemessenen ΔT_m sowie die abweichenden T_m sind möglicherweise auf die abweichende Sequenz zurückzuführen. Denkbar wäre jedoch auch, dass die auftretende Hysterese zwischen Heiz- und Kühlzyklen nicht berücksichtigt worden ist. Wie auch schon beim Palindrom, führen die Spinlabel auch in diesem Fall laut Schmelzpunkt nur zu einer geringfügigen Störung der Sekundärstruktur.

Beim in-line probing wird durch eine hohe Magnesiumkonzentration eine teilweise Hydrolyse einer am 5'-Ende markierten RNA induziert. Das lewis-saure Mg^{2+} koordiniert an das Phosphatrückgrat der RNA, wo es den nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe erleichtert. Dies führt unter Bildung eines 2',3'-Cyclophosphats zum Strangbruch. Je nachdem an welcher Stelle der Strangbruch induziert wird, entstehen unterschiedlich lange Bruchstücke, welche anschließend mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Länge aufgetrennt werden. Aus der Häufigkeit, sprich der Signalintensität, dieses Ereignisses lassen sich Rückschlüsse auf die strukturelle Anordnung der RNA schließen. Damit es zum Strangbruch kommt, müssen Nukleophil, Elektrophil und Abgangsgruppe in einem annähernd 180° Winkel zueinander angeordnet (in-line Anordnung) sein. Bei Abschnitten, die als Duplex vorliegen, können die Reaktionspartner diese Anordnung nicht annehmen, weshalb nur konformationell flexible Bereiche der RNA gespalten werden können.⁴⁸ Um die lokalen Effekte der TPA-Label aufzudecken, wurde zunächst die unmodifizierte RNA **IX** bei $37^\circ C$ inkubiert und analysiert (siehe Abbildung 74A). Die ersten fünf Nukleotide sind Teil einer Duplexstruktur, weswegen dort so gut wie keine Spaltung zu beobachten war. Starke Spaltung konnten an den Positionen C(6), U(7) und U(8) sowie U(13) bis U(18) festgestellt werden. Diese Spaltpositionen decken sich mit konformationell flexiblen Positionen wie aus Abbildung 72 ersichtlich.

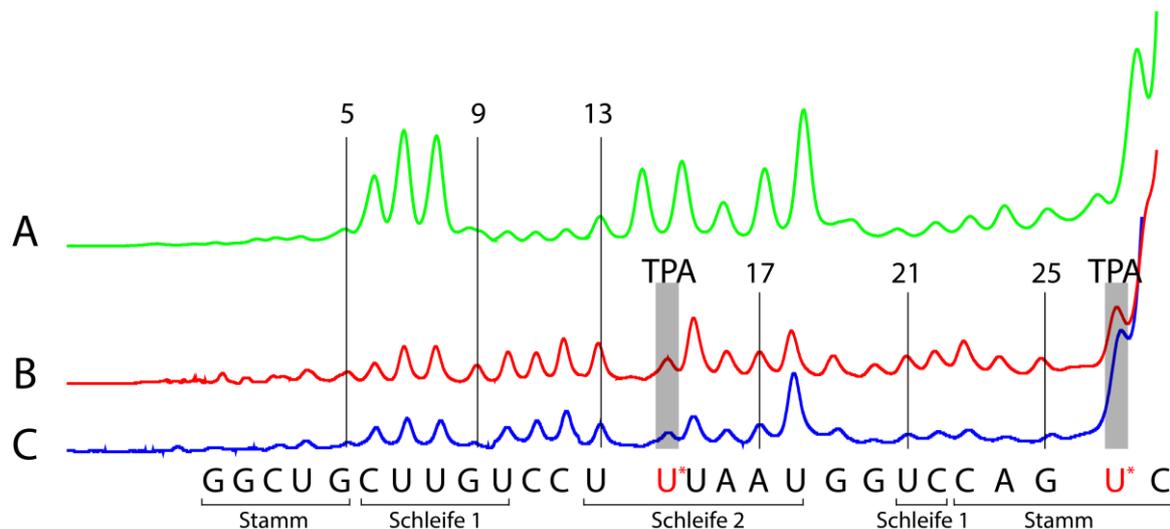


Abbildung 74: Sekundärstrukturuntersuchung mittels in-line probing der RNAs **IX** und **X**. **A**: Inkubation von RNA **IX** bei $37^\circ C$ (20 h, 20 mM Mg^{2+}). **B**: Inkubation von RNA **X** bei $37^\circ C$ (20 h, 20 mM Mg^{2+}). **C**: Inkubation von RNA **X** bei $4^\circ C$ (110 h, 20 mM Mg^{2+}). Die vollständigen Daten für das in-line probing sind in Abschnitt 4.6 (Abbildung 128) gezeigt.

Die Signale für G(9) und U(10) sowie U(21) und C(22), welche ebenfalls Spaltung zulassen sollten, sind jedoch nur schwach ausgeprägt. Anders als der Strukturvorschlag von Weigand *et al.*²⁶³ weist das in-line probing auf reduzierte Flexibilität dieser Positionen hin. Dies geschieht wahrscheinlich durch Basenpaarung zwischen den Positionen G(9) und C(22) sowie U(10) und U(21). Eine Folgearbeit von Duchardt-Ferner *et al.*²⁶⁴ stellte in Anwesenheit entsprechender Liganden (Neomycin und Ribostamycin) ebenfalls eine hoch strukturierte Konformation fest (siehe Abbildung 75), in welcher die

beiden zusätzlichen Basenpaare auftreten. Die hohe Magnesiumkonzentration, die für die teilweise Hydrolyse notwendig ist, ersetzt wahrscheinlich den polykationischen Liganden, so dass auch in Abwesenheit dessen, die entsprechende hoch strukturierte Konformation bevorzugt vorliegt.

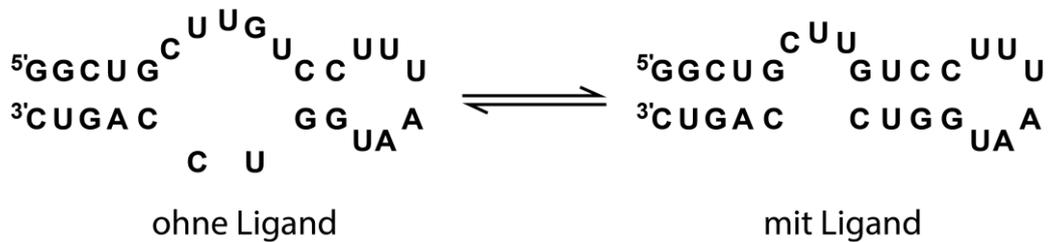


Abbildung 75: Sekundärstruktur des Neomycin Aptamers in Abwesenheit eines Liganden (links) und in Anwesenheit eines Liganden (rechts).^{263,264}

Führt man das gleiche Experiment mit der gelabelten RNA **X** durch, so verschiebt sich das erhaltene Chromatogramm, sobald die erste markierte Position U(14) erreicht wird (siehe Abbildung 74B: Inkubation von RNA **X** bei 37 °C). Durch die zunehmende Größe bei ansonst gleicher Ladung retardieren Fragmente mit ein oder zwei TPA-Label deutlich langsamer, erkennbar durch den vergrößerten Abstand zwischen den Positionen U(13) und U(14) bzw. G(25) und U(26). Gleichzeitig steigt die Spaltintensität ab U(8) signifikant an mit Ausnahme der TPA-Positionen, was wahrscheinlich auf die sterische Abschirmung des Labels zurückzuführen ist. Im Allgemeinen führt aber das Einführen der Label zu einer Destabilisierung in beinahe allen Positionen. Verringert man die Temperatur der Spaltung auf 4 °C bei gleichzeitiger Verlängerung der Inkubationszeit (siehe Abbildung 74C: Inkubation von RNA **X** bei 4 °C) verringert sich die Spaltung. Dies veranschaulicht nochmals, obwohl die Erniedrigung des T_m nur bei 3.5 °C liegt, ist eine Absenkung der Inkubationstemperatur auf 4 °C notwendig, um die Sekundärstruktur mittels in-line probing nachzuweisen, man ist aber immer noch nicht auf dem Niveau des unmodifizierten Aptamers angelangt. Die Auswirkung der Label auf die lokale Struktur bleibt durch den Schmelzpunkt unerkant. Dies kann dazu führen, dass bei temperaturempfindlichen Proben oder der Verwendung wenig flexibler Spinlabel wie dem C-Spin keine Sekundärstrukturen ausgebildet werden können oder im Rahmen mechanistischer Untersuchungen diese durch den störenden Einfluss der Label verfälscht werden.

3.1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieses Projektes gelang es, die Palette an verfügbaren photolabil geschützten Phosphoramiditen sowohl um ein Uridinderivat als auch ein Cytidinderivat zu erweitern. Die anfänglichen Probleme mit der zu schützenden 2'-OH-Gruppe, die zunächst durch TOM und dann durch CEM verursacht wurden, konnten durch den erneuten Wechsel der Schutzgruppe zu TBDMS gelöst werden. Das Problem der nicht zu trennenden Regioisomere im Falle der TOM-Gruppe sollte aufgrund der besseren Trennleistung durch den Einsatz präparativer HPLC zu beheben sein.

Problematisch ist dennoch weiterhin die hohe Toxizität der bei der Herstellung notwendigen Zinnverbindungen. Die Verwendung selbst hergestellter Phosphoramidite mit TOM-Schutzgruppe sollte nur dort in Betracht gezogen werden, wo die verbesserte Kupplungsausbeute notwendig erscheint, wie bei sehr langen Oligonukleotiden oder schlechten Kupplungsausbeuten des Sonderamidits. Die CEM-Gruppe erwies sich als einfach einzuführen und durch die temporäre Maskierung der 3'- und 5'-Position während der Synthese, ergab sich auch nicht das Problem auftretender Regioisomere. Dennoch ist hier ein gewisser Mehraufwand zu leisten, und durch die zusätzliche Schutzgruppe ist sie in atomökonomischer Sicht die uninteressanteste der hier verwendeten Schutzgruppen. Das Ersetzen der nukleophilen Fluoridionen durch Hydrid oder sterisch anspruchsvolle Basen könnte auch das Problem der Zersetzung beheben und den Einsatz der CEM-Gruppe mit konjugierten Mehrbindungssystemen ermöglichen.

Die Synthese des TPA-Bausteins verlief in weiten Teilen problemlos und in guten Ausbeuten, wobei die beiden Schlüsselschritte, Darstellung des Alkins und die Schützung des Radikals mit der photolabilen Schutzgruppe, nur in akzeptablen Ausbeuten zu realisieren waren. Die Alkynsynthesen auf Basis von Ohira-Bestmann oder der Peterson-Olefinierung verwenden im Reaktionsverlauf einen 1,3-Dipol, welcher auch in einer dipolaren Cycloaddition reagieren kann. Die Alternative Corey-Fuchs erwies sich ebenfalls als unpraktikabel. Das Problem an dieser Reaktion ist vermutlich die Zersetzung

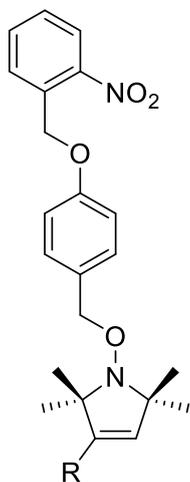


Abbildung 76: Vorschlag einer potenziellen Schutzgruppe, die bei geringeren Temperaturen vollständig eliminiert.

des Radikals beim Erwärmen. Die Änderung der Reaktionsschritte könnte an dieser Stelle zu einer verbesserten Ausbeute bei der Alkynsynthese führen. Es wäre jedoch abzuwarten, ob die Dreifachbindung die anschließende Oxidation des Amins und die entsprechende Schützung des Radikals überstünde. Die Probleme bei der Schützung sind jedoch nicht auf eine konkurrierende Reaktion zurückzuführen, vielmehr bereitet die unzureichende Qualität der chlorierten Schutzgruppe Schwierigkeiten. Eine Reinigung mittels Destillation oder Chromatographie scheiterte an der Zersetzung des Produktes. An dieser Stelle herrscht noch eindeutiger Optimierungsbedarf, obwohl dieser Flaschenhals an diesem frühen Punkt der Synthese noch zu verkräften ist. Die geschützte Spezies ist in Multigrammmengen zugänglich.

Aber auf lange Sicht wäre das Etablieren einer neuen Schutzgruppe wünschenswert, da nach dem Abspalten der NBOM-Gruppe ein Halbacetal am Nitroxid verbleibt, welches durch Hitze eliminiert werden muss. Hier bietet der Linker Platz für Modifizierungen. Zwar gibt es Anzeichen dafür, dass NBOM in Kombination mit TPA zu einer beschleunigten Freisetzung des Hydroxylamins tendiert, diese

Ergebnisse sind jedoch noch nicht näher untersucht worden, obwohl ein genauerer Blick sich als lohnend erweisen könnte. Als Alternative für den notwendigen Linker zwischen Nitroxid und Nitrobenzyl könnte statt Formaldehyd ein Chinonmethid verwendet werden (siehe Abbildung 76). Ähnliche Schutzgruppen wurden bereits von Klötzner *et al.* bei der Freisetzung von nahinfrarot Farbstoffen verwendet.²⁶⁵ Das Chinonmethid sollte im Vergleich zu Formaldehyd die bessere Abgangsgruppe sein und leichter eliminiert werden können, wodurch auf eine erhöhte Temperatur verzichtet werden kann. Dies ist vor allem für hitzeempfindlichen Proben essenziell. Das Hinzufügen von elektronenschiebenden Substituenten am Linker, um die Eliminierung zu erleichtern, verlagert das Problem lediglich auf die Festphasensynthese. Allein nur der Austausch von Wasserstoff gegen eine Methylgruppe senkt die Beständigkeit der Schutzgruppe gegen Säure erheblich.

Im weiteren Verlauf konnte durch den Einbau des Uridinderivats in unterschiedliche RNA-Sequenzen die vollumfängliche Nutzbarkeit der geschützten TPA-Label in der automatisierten Festphasensynthese demonstriert werden. Außerdem zeigte sich durch EPR-Messungen, dass die Rückgewinnung des Radikalcharakters nach Abspaltung der NBOM-Gruppe beinahe quantitativ verläuft und so Proben von ausgezeichneter Qualität zugänglich sind. Durch Kombination von in-line probing und Schmelzpunktmessungen beim Neomycin-Aptamer zeigte sich zudem, dass es nicht ratsam ist, sich nur auf eine einzige Methode zu verlassen. Denn obwohl der Schmelzpunkt nur einen geringen Einfluss der Label auf die Stabilität der Sekundärstruktur zeigte, offenbarte das in-line probing lokale Effekte erheblichen Ausmaßes.

Die nächsten Schritte wären sicherlich der Einsatz beider Derivate in komplexeren und biologisch bedeutenden Konstrukten wie der 7SK-RNA. Dies setzt den Zugang zu sehr langen Oligonukleotidsequenzen voraus, 7SK besteht beispielsweise aus über 300 Nukleotiden. Solche Längen sind über die Festphasensynthese nicht zugänglich. Stattdessen müssten mehrere Teilstücke synthetisiert werden, um sie später über Ligation miteinander zu verbinden. An dieser Stelle käme eine weitere Stärke der NBOM-Gruppe zum Tragen. Anders als die von Sigurdsson *et al.* entwickelten Acetyl- oder Benzoylschutzgruppen für Nitroxidradikale, die nur während der Festphasensynthese das Radikal schützen, bleibt die NBOM-Gruppe auch während der Isolierung der Oligonukleotide stabil. Dadurch wird eine spätere Ligation ermöglicht, ohne dass die thiolhaltigen Puffer zur Reduktion des Radikals führen.

3.2 Spinlabel für den Einsatz in Proteinen

In diesem Abschnitt soll die Darstellung dreier verschiedener Molekülstrukturen diskutiert werden, die zur Herstellung spinmarkierter Peptide gedacht sind. Beginnend mit der Syntheseplanung und dem gedachten Verwendungszweck schließen sich an die Synthese Zusammenfassung und Ausblick an.

3.2.1 Geschütztes Lysinderivat

Syntheseplanung. Das Lysinderivat wird am Ende der Synthese aus zwei Teilstücken zusammengesetzt. Zum einen der TPA-Label **44**, dessen Synthese zum Großteil bereits diskutiert worden ist und nur einer geringen Modifikation bedarf und zum anderen aus dem Lysinbaustein **49**, bei welchem die beiden Aminogruppen orthogonal geschützt werden müssen, um sie separat voneinander adressieren zu können. Der TPA-Baustein geht von dem bereits bekannten, geschützten Weinrebamid **8** aus. Dieses soll durch zweimalige Reduktion in den entsprechenden Alkohol **44** überführt werden, um im Anschluss mit der ϵ -Position des Lysinbausteins verknüpft zu werden. Beginnend mit kommerziell erhältlichem Lysin (**45**) muss zunächst durch Komplexierung mit Kupfer die α -Aminogruppen maskiert werden. Anschließend ist eine Cbz-Schutzung der verbleibenden Aminogruppe und Dekomplexierung zu Verbindung **46** geplant. Durch Derivatisierung von Carbonsäure und der zweiten Aminogruppe zu Verbindung **48** kann durch das Entfernen der Cbz-Gruppe die zur Kupplung benötigte Aminogruppe wieder freigesetzt werden. Nach der Kupplung von **49** mit **44** müssen nur noch die Schutzgruppen abgespalten werden. Der vollständige Synthesepfad ist in Abbildung 77 gezeigt.

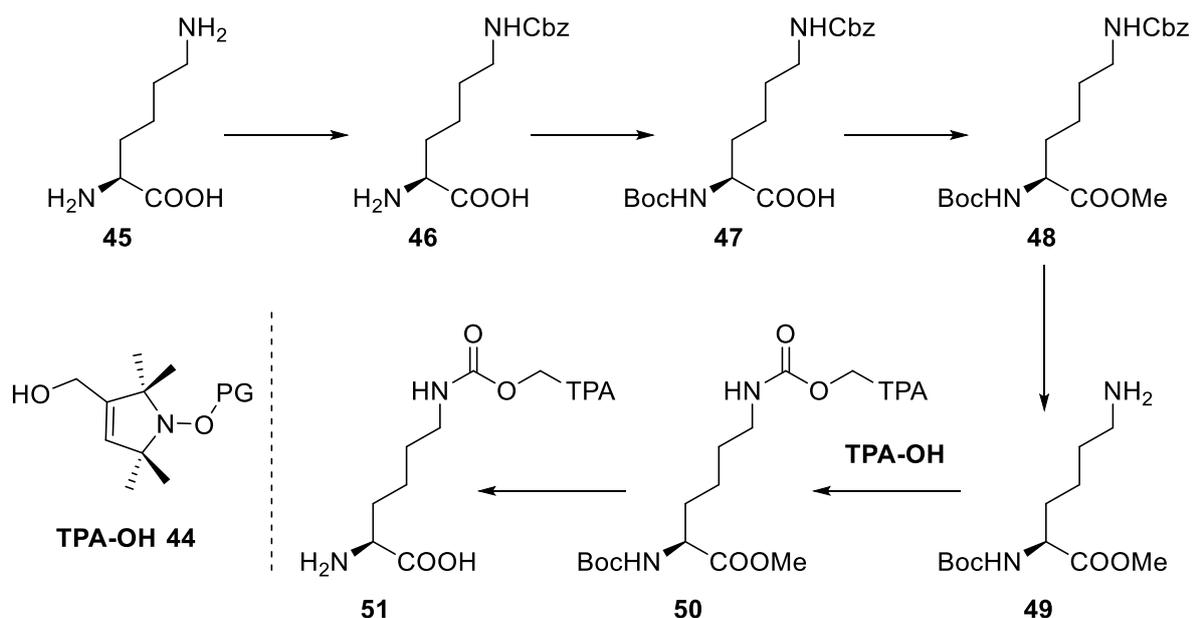


Abbildung 77: Syntheseroute für die Darstellung des photolabil geschützten Lysinderivats **51** ausgehend von kommerziell erhältlichem Lysin (**45**).

Ziel ist es Verbindung **51** unter Zuhilfenahme eines artifiziellen tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paares über eine Erweiterung des genetischen Codes ortsspezifisch einzubauen. Zumeist wird das Amber-Codon (UAG) als Erkennungssequenz für den Einbau der nichtkanonischen Aminosäure genutzt. Über Punktmutationen lässt sich so an beliebigen Stellen einer mRNA dieses Basentriplett erzeugen. Jedoch steht die Elongation des Proteins hierbei in Konkurrenz mit der eigentlichen Aufgabe des Amber-Codons, der Terminierung der Proteinbiosynthese. Eine schutzgruppenfreie Variante des Lysinderivats wurde bereits erfolgreich mit einer Mutante der Pyrrolyl-tRNA-Synthetase aus dem Organismus *Methanosarcina mazei*²⁶⁶ an unterschiedlichen Stellen in GFP und Thioredoxin eingebaut²⁶⁷.

Darstellung des geschützten Lysinderivats. In einem ersten Schritt sollen die beiden Aminogruppen des Lysins (**45**) durch die Komplexierung mit Kupfer unterscheidbar gemacht werden. Die Carbonsäure und die α -Aminogruppe zweier Lysine bilden hierbei einen quadratisch-planaren Komplex mit dem Kupfer aus. Anschließend konnte durch Zutropfen von Benzylchlorformiat (Z-Chlorid) die nicht komplexierte Aminogruppe mit einer Cbz-Gruppe geschützt werden. Durch anschließendes Erhitzen des Kupferkomplexes in wässriger EDTA-Lösung konnte die Komplexierung des Lysins aufgehoben und Verbindung **46** problemlos und in sehr guten Ausbeuten isoliert werden (siehe Abbildung 78).

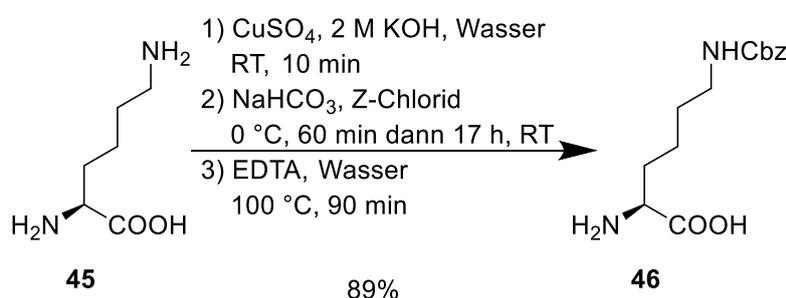


Abbildung 78: Darstellung von Verbindung **46**.

Im Anschluss sollte die verbleibende Aminogruppe orthogonal mit Boc geschützt werden, um die beiden Aminogruppen unabhängig voneinander adressieren zu können, sowie die Carbonsäure in den entsprechenden Methylester überführt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst Verbindung **46** mit Bocanhydrid zu Verbindung **47** umgesetzt, welche anschließend mit Methyljodid zu Methylester **48** weiter reagierte. Beide Reaktionen verliefen problemlos und die jeweiligen Produkte ließen sich in sehr guten Ausbeuten isolieren (siehe Abbildung 79). Die Umsetzung der Carbonsäure zum Ester dient primär dem Zweck in den darauffolgenden Schritten die Löslichkeit der Verbindung in organischen Lösungsmitteln nach dem Entfernen der Cbz-Gruppe zu erhöhen. Nachrangig wird das Carboxylat als potenzielles Nukleophil für eine spätere Reaktion, in welcher eine freigesetzte Aminogruppe mit einem Elektrophil reagiert, maskiert.

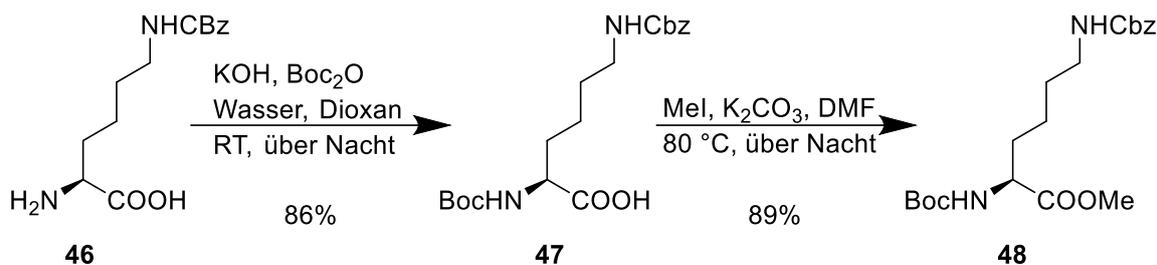


Abbildung 79: Synthese von Verbindung **48**.

Für den benötigten TPA-Baustein **44** wird von dem bekannten Weinrebamid **8** ausgegangen. Durch schrittweise Reduktion mit DIBAL und dann Natriumborhydrid wird das Amid zunächst in den Aldehyden **9** und anschließend in den entsprechenden Alkohol **44** überführt. Die Reduktion wird in diesem Fall auf zwei Teilschritte aufgeteilt, da Verbindung **8** eine α,β -ungesättigte Verbindung ist und diese durch den Einsatz von Lithiumaluminiumhydrid (LAH) reduziert werden könnte. Beide Schritte verliefen problemlos und lieferten ausgezeichnete Ausbeuten (siehe Abbildung 80). Zumal durch die Vermeidung von LAH ein erhebliches Gefahrenpotential vermieden werden kann, sofern es als Pulver und nicht als Suspension eingesetzt wird.

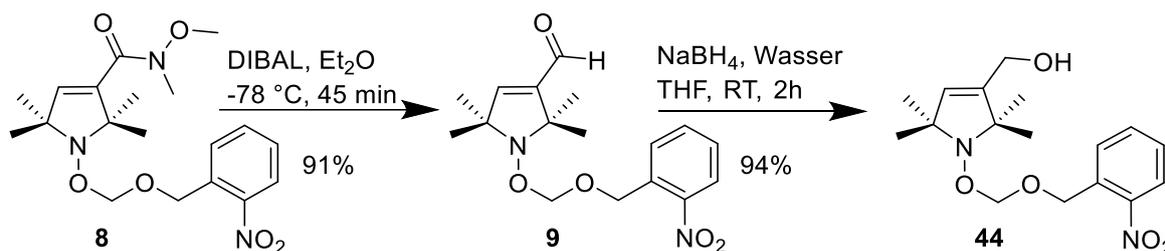


Abbildung 80: Synthese von Verbindung **44**.

Um die beiden Bausteine miteinander verbinden zu können, musste zum einen die Cbz-Schutzgruppe mittels Hydrogenolyse entfernt werden, dies geschah mit Pd/C und H₂. Zum anderen musste eine der beiden nukleophilen Gruppen in ein Elektrophil umgewandelt werden, dies geschah durch den Einsatz von Carbonyldiimidazol (CDI). CDI ist ein Syntheseäquivalent von Phosgen aber deutlich sicherer und kann, da es ein Feststoff ist, abgewogen werden. Außerdem ist es ähnlich reaktiv wie Triphosgen. Der Alkohol **44** und nicht das Amin **49** wurde zunächst mit CDI zu einem Acylimidazolderivat umgesetzt. Zum einen ist das Amin das potentere Nukleophil und zum anderen würde der Stickstoff wegen seines höheren +M-Effekts die Elektrophilie der Carbonylgruppe herabsetzen. Anschließend wurden der aktivierte TPA-Baustein **52** und das an ϵ -Position entschützte Lysinderivat **49** zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 81). Das geschützte Lysin **50** konnte problemlos in guten Ausbeuten isoliert werden.

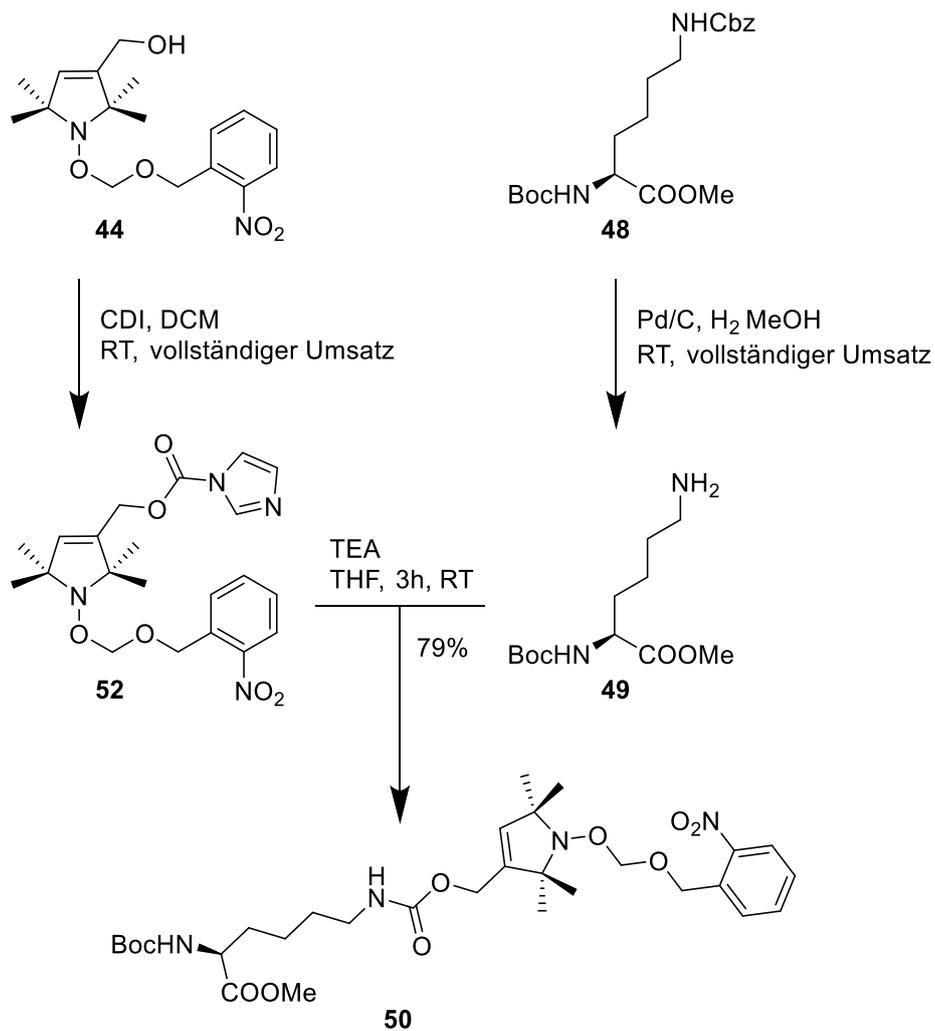


Abbildung 81: Synthese des photolabil geschützten Lysinderivats **50**.

Durch anschließende Verseifung des Methylesters zur Carbonsäure und Abspaltung der Boc-Gruppe durch ein DCM/TFA-Gemisch ließ sich Verbindung **51** mit RP-HPLC isolieren (siehe Abbildung 82). Da es sich bei den HPLC-Säulen um semipräparative Säulen handelte, wurde der Reaktionsansatz aus Kapazitätsgründen nicht vollständig getrennt, sodass keine Aussage bezüglich der erzielten Ausbeute getroffen werden kann.

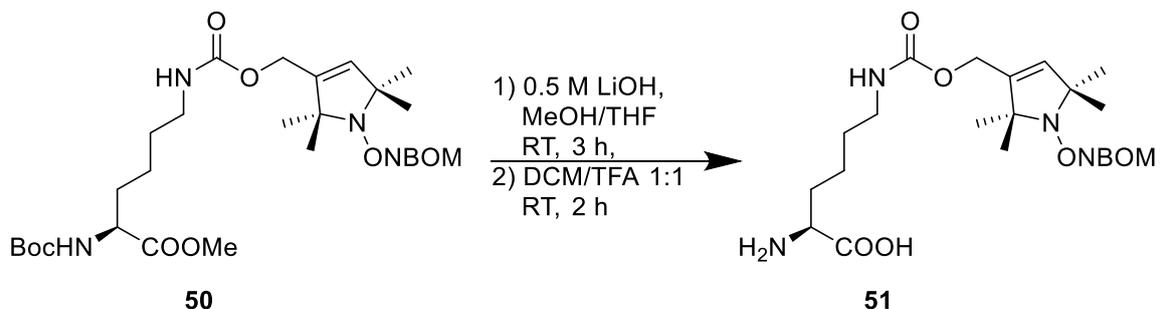


Abbildung 82: Entschützung von Verbindung **50** zu Verbindung **51**.

EPR–Untersuchung. Verbindung **51** wurde anschließend unter den etablierten Belichtungsbedingungen bestrahlt. Das TFA–Salz, als welches Verbindung **51** nach der RP–HPLC vorliegt, ist im Belichtungspuffer löslich, sodass hier keine zusätzlichen Lösungsmittel wie DMSO oder Acetonitril notwendig waren. Nach der Bestrahlung erfolgte der obligatorische Erhitzungsschritt, um das Halbacetal zu eliminieren. Das Spektrum der nachfolgenden cw–Messung ist in Abbildung 83 gezeigt. Dadurch, dass hier ein kleines Molekül untersucht wird, welches schnelle Orientierungsänderungen durchlaufen kann, mittelt sich der anisotrope Anteil aus und die Absorptionslinien erscheinen gleich hoch und weisen keine Verbreiterung auf.

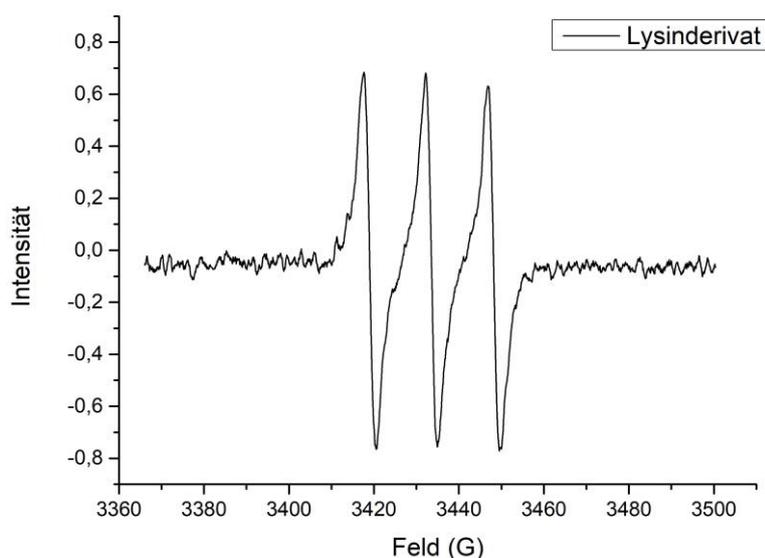


Abbildung 83: cw–Messung des entschützten Lysinderivats **51**.

Zusammenfassung und Ausblick. In diesem Abschnitt konnte ausgehend von kommerziell erhältlichem Lysin (**45**) in einer einfachen zwölfstufigen Synthese eine photolabil geschützte, nicht kanonische Aminosäure **51**, die mittels eines artifiziellen tRNA/Aminoacyl–tRNA–Synthetase–Paares in Proteine inkorporiert werden soll, synthetisiert werden. Die Ausbeuten liegen fast ausschließlich auf einem sehr guten bis ausgezeichneten Niveau. Die nächsten Schritte müssten sicherlich die Validierung des Einbaus der Aminosäure sein. Je nachdem ob der Einbau mit dem tRNA/Aminoacyl–tRNA–Synthetase–Paar gelingt oder nicht, könnten EPR–Studien an biologisch relevanten Proteinen und Peptiden geplant werden oder man müsste eine andere Synthesestrategie verfolgen. Zwar ist die Optimierung der Synthetase möglich, die ist jedoch kosten– und zeitintensiv, sodass ein Abändern der Synthese plausibel erscheint. Ein valider Ansatz wäre sicherlich die Zerteilung des Moleküls, um sie nach der Proteinbiosynthese beispielsweise durch den Einsatz von Click–Chemie aneinander zu koppeln, (siehe Abbildung 84) wozu es bereits eine Vielzahl an Arbeiten sowohl für kupferhaltige als auch kupferfreie Varianten gibt, insbesondere von Daniel Summerer und Malte Drescher.^{212,268–271}

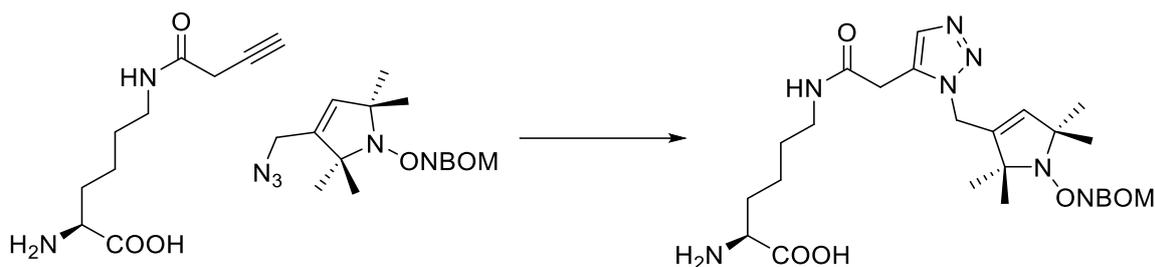


Abbildung 84: Vorschlag für ein zweigeteiltes Lysinderivat, welches erst nach der Proteinbiosynthese komplettiert wird. Die Funktionalitäten könnten alternativ auch vertauscht werden, auch ist Position der Funktionen im Falle des Lysins variabel. Sowohl Alkin als auch Azid könnten das Amin ersetzen.

3.2.2 Spinlabel zum „Clicken“

In Zusammenarbeit mit Christina Heil aus dem AK Grininger sollte ein „clickbarer“ Spinlabel synthetisiert werden, welcher nicht auf Kupfer angewiesen ist, um ihn in der empfindlichen Fettsäuresynthese einsetzen zu können. Hierzu wurde auf Vorarbeiten von Carolyn Bertozzi zurückgegriffen, die bereits 2004 erste auf Ringspannung begründete Alkine vorstellte, die ohne Kupfer als Katalysator reaktionsfähig waren.^{272,273} Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt stark von der Ringspannung, welche wiederum von Ringgröße und konformationeller Flexibilität geprägt ist, und der energetischen Lage des LUMOs ab. Durch das Hinzufügen elektronenziehender Reste sowie zusätzlicher sp^2 -konfigurierter Kohlenstoffe im Ring lässt sich die Reaktivität deutlich steigern.^{273–275} Auf Basis der sp^2 -Kohlenstoffe entwickelte Ning *et al.* einen Dibenzocyclooctinbaustein (DBO), welcher Grundlage dieses Projektes ist.²⁷⁵ Kalai *et al.* verwendete den gleichen Baustein bereits zur Markierung von Proteinen, wobei er das Label über einen Ether an das DBO knüpfte. Unser Ziel ist es den Ether durch eine weniger flexible Funktion zu ersetzen und die Synthese des DBO-Bausteins zu optimieren. Die Synthese orientiert sich an einer etablierten Methode von Kornmeyer *et al.*²⁷⁶

Syntheseplanung. Ausgehend von Dibenzosuberenon (**53**) erfolgt zunächst die Bromierung der verbrückenden Doppelbindung, welche später in das Alkin überführt werden kann. Nach Eliminierung hin zum Vinylbromid **55** folgt die Ringerweiterung über eine Wolff-artige Umlagerung zum entsprechenden 8-Ring **56**. Hieran schließen sich die Reduktion des Ketons zum Alkohol **57** und dessen Schützung mit einer TBDMS-Gruppe an. Woraufhin die basenvermittelte Eliminierung des zweiten Bromatoms unter Bildung des Alkins **59** erfolgt. Der letzte Schritt ist die Abspaltung der TBDMS-Gruppe mit einer Fluoridquelle zu Verbindung **60**. Über eine Steglichveresterung kann nun der Spinlabel **61** an den Linker unter Bildung von Verbindung **62** gekuppelt werden. Der Spinlabel ist in diesem Fall nicht mit der NBOM-Gruppe geschützt, da die vorherrschenden Bedingungen nicht zu einer Reduktion des Radikals führen würden. Die Syntheseroute ist in Abbildung 85 gezeigt.

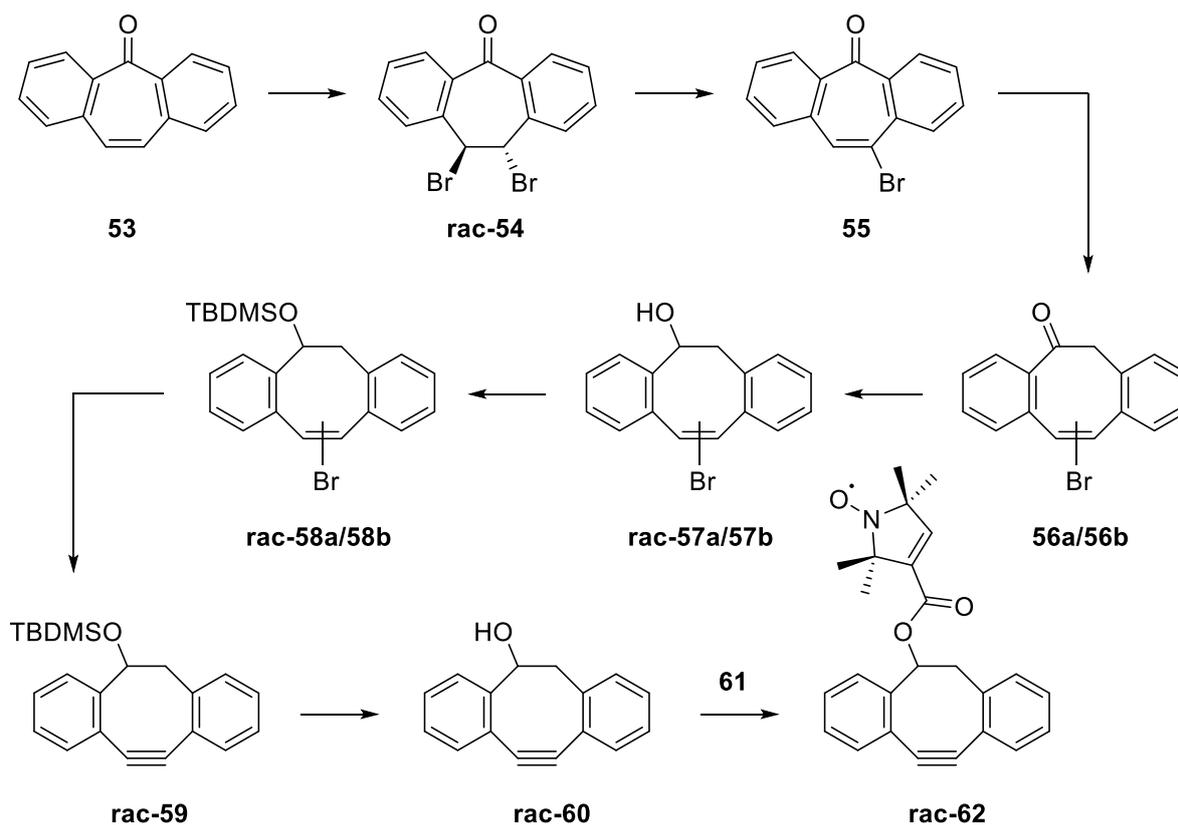


Abbildung 85: Syntheseroute für die Darstellung des ohne Kupfer „clickbaren“ Dibenzocyclooctinspinlabels **rac-62**.

Darstellung des Dibenzocyclooctin. Die erste Reaktion wandelte die verbrückende Doppelbindung des Suberenons **53** in ein Dibromalkyl **rac-54** um. Die beiden Bromatome sind notwendig, um im späteren Verlauf der Synthese über eine zweifache Eliminierung von Hydrobromid das Alkin erzeugen zu können, über welches der Linker mit dem Protein verknüpft werden soll. Die Reaktion verlief problemlos und konnte in ausgezeichneten Ausbeuten realisiert werden. Eine weitere Umsetzung zu Verbindung **55**, was eine Eliminierung von Hydrobromid darstellt, war ohne weitere Reinigung möglich (siehe Abbildung 86). Die Bildung stabiler cyclischer Alkine ist erst ab einer Ringgröße von acht beteiligten Kohlenstoffen möglich, weswegen auch eine zweite Eliminierung hin zum Alkin nicht zu beobachten war. Das Einhalten der KOH-Konzentration ist wichtig, da sich das Vinylbromid ansonst zur entsprechenden Methoxyverbindung umsetzt.²⁷⁷

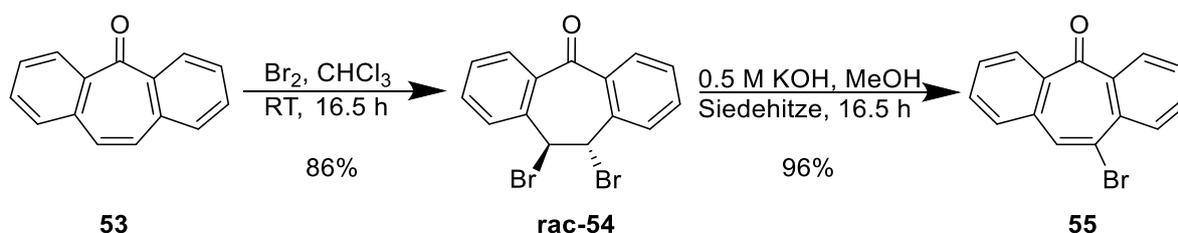


Abbildung 86: Synthese von Verbindung **55**.

Im folgenden Reaktionsschritt wird der 7-Ring in einer Wolff-artigen Umlagerung mit TMS-Diazomethan zum 8-Ring umgesetzt. Die Verwendung von TMSCHN₂ bietet sich an, da es kommerziell erhältlich, wesentlich stabiler ist und im Vergleich zu Diazomethan weniger stark zu explosivem Verhalten neigt. Außerdem wirkt sich die TMS-Gruppe positiv auf den Reaktionsverlauf, was vermutlich auf den stabilisierenden Effekt des Siliziums auf negative Ladungen in α- bzw. positive Ladungen in β-Position zurückzuführen ist. Der folgende mechanistische Vorschlag postuliert eben jene Ladungen im Verlauf der Reaktion (siehe Abbildung 87). Hierbei koordiniert die Lewisäure Bortrifluorid an den Carbonylkohlenstoff, was dessen Elektrophilie gegenüber dem nukleophilen Angriff des Diazomethans erhöht. Durch das Abspalten von Stickstoff aus dem Intermediat **64** kommt es zum konzertierten Ausbilden der Carbonylgruppe und einer der Reste lagert in einer 1,2-Verschiebung um. Welcher der Reste wandert, ist nicht klar, sodass ein Regioisomerengemisch im Bezug auf die Position des Bromatoms entsteht. Durch die Zugabe von Wasser hydrolysiert das Bortrifluorid zu Borsäure und Fluorwasserstoffsäure. Das freie Fluorid spaltet unter Bildung des Enols **65a/65b** die TMS-Gruppe ab und das Enol kann zum Keton tautomerisieren. Möglicherweise erfolgt die Abspaltung der TMS-Gruppe bereits Lewis-Säure-induziert und das Wasser dient nur der Hydrolyse des Addukts.

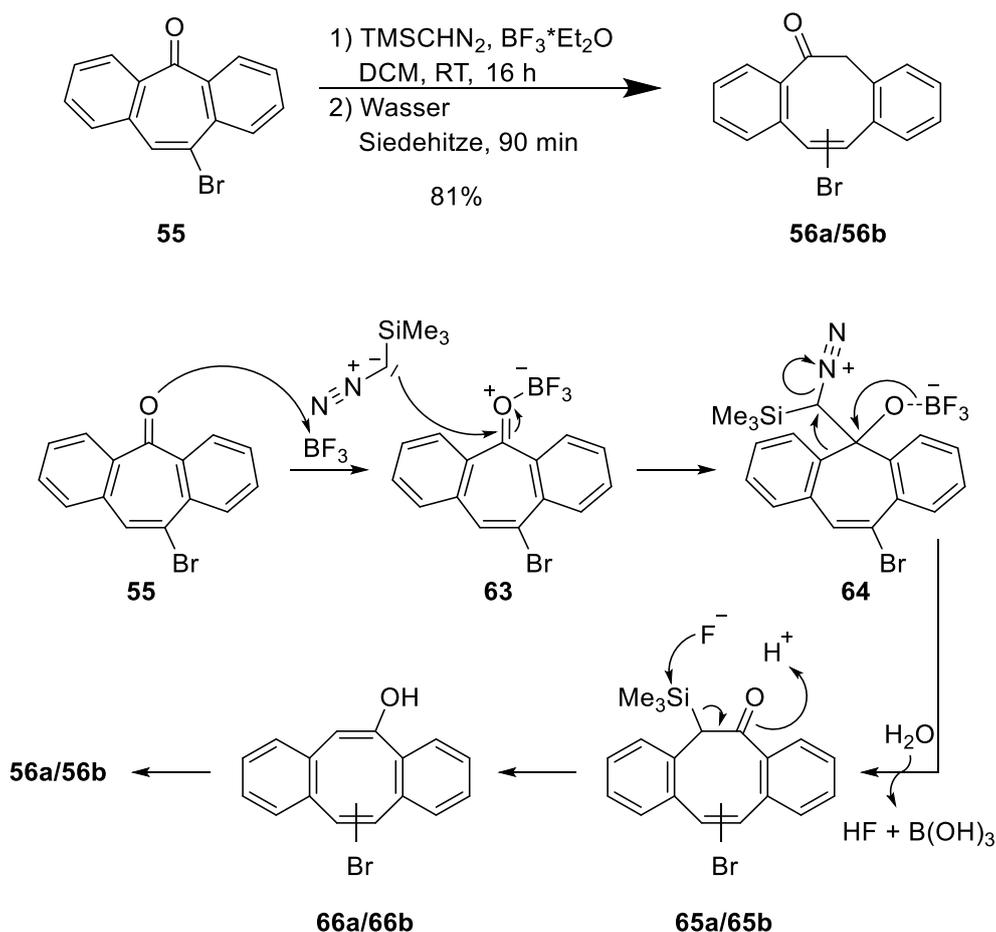


Abbildung 87: Darstellung des Regioisomerengemisches **56a/56b** über eine Wolff-artige Umlagerung.

Auf dieser Stufe wurde noch Aluminiumtrichlorid als alternative Lewis-Säure untersucht sowie ein Absenken der Temperatur auf 0 °C. Dabei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in Ausbeute oder Reaktionsgeschwindigkeit. Da die Reaktion nicht regioselektiv verlaufen kann, war die Beobachtung zweier Isomerer Verbindungen zu erwarten. Diese konnten weder mittels Säulenchromatographie noch durch Umkristallisation getrennt werden, sodass eine Trennung mittels HPLC erfolgte, um die Erwartungshaltung zu bestätigen. Es konnten hierbei zwei Stoffe isoliert werden. Ein farbloser Feststoff, welcher in Einklang mit der Literatur steht²⁷⁶ (siehe Abbildung 88) und ein farbloses Öl, welches nicht in der Literatur erwähnt wird (siehe Abbildung 89).

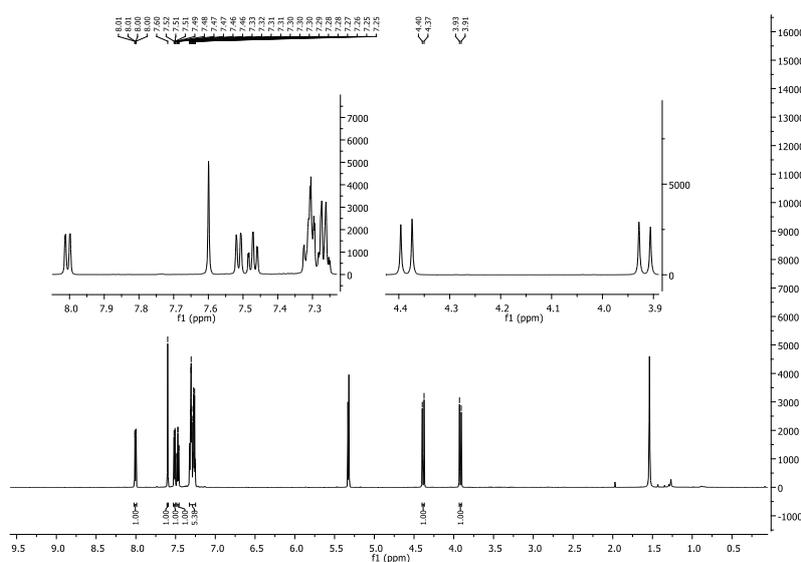


Abbildung 88: ¹H-NMR des farblosen Feststoffes **56**.

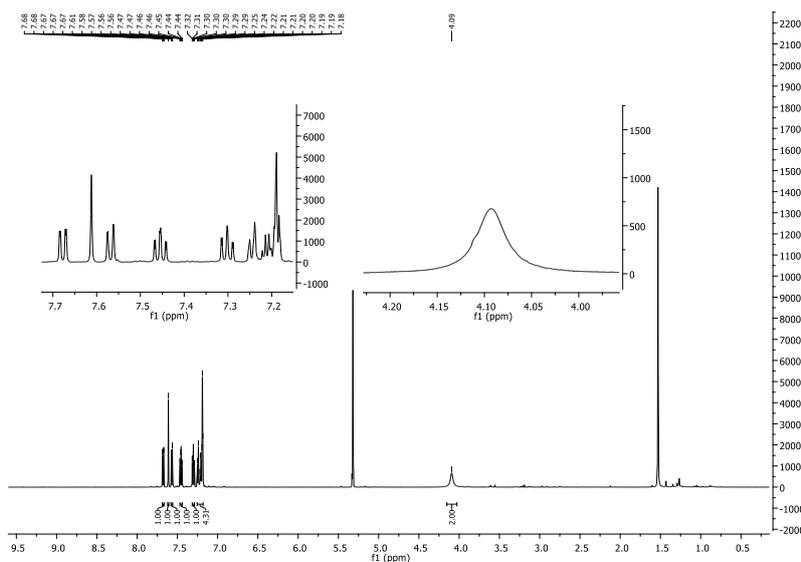


Abbildung 89: ¹H-NMR des farblosen Öls **56**.

Die Integrale beider Spektren wurden jeweils auf das Singulett bei 7.60 ppm kalibriert, welches für das vinylische Proton in Verbindung **56** steht. In Abbildung 88 spalten sich das Signal der CH₂-Gruppe in

zwei Dupletts bei 4.38 ppm und 3.92 ppm auf. Die Aufspaltung könnte durch die in Bezug auf die NMR-Zeitskala langsame Konformationsänderung der nicht planaren Achtringe **56a** und **56b** liegen. Das farblose Öl (Abbildung 89) weist diese Dupletts nicht auf. Hier liegt ein breites Singulett bei 4.09 ppm vor. Die Integrale betreffend gleichen sich beide Stoffe, daher liegt die Wahrscheinlichkeit nahe, dass es sich um das bereits erwähnte Regioisomere handelt. Dass das Signal der CH₂-Gruppe in Abbildung 89 nicht aufspaltet, könnte daran liegen, dass dieses Isomer zu einem höheren Anteil als das andere Isomer in der Enol-Form vorliegt und die beiden Protonen durch Austausch im breiten Singulett bei 4.09 ppm zusammenfallen. Vielleicht ist auch Kinetik der Konformeren-Isomerisierung schneller, so dass die beiden Dupletts der CH₂-Gruppe fast zusammenfallen. Aus ungeklärten Gründen konnten keine Massenspektren für die beiden Stoffe ermittelt werden.

Anschließend wurde die Ketogruppe mit DIBAL zum entsprechenden Alkohol **rac-57a/57b** reduziert (siehe Abbildung 90). Auf dieser Stufe gelang es auch die Regioisomere säulenchromatographisch voneinander zu trennen. Aus Sicherheitsgründen wurde jedoch nur mit der literaturbekannten Verbindung weitergearbeitet, da auch auf dieser Stufe keine Massen gemessen werden konnten. Sofern den beiden Isomeren die unterschiedlichen Fraktionen zugeordnet werden können, so verlief die Reaktion problemlos und in ausgezeichneten Ausbeuten.

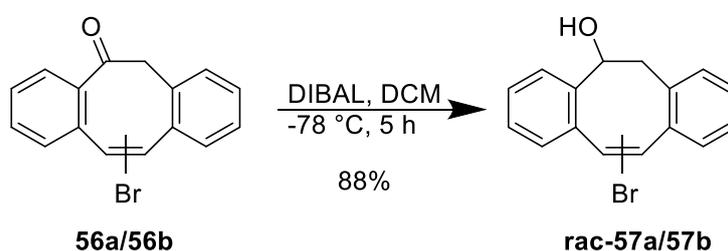


Abbildung 90: Reduktion des Ketons **56a/56b** zu Verbindung **rac-57a/57b**.

Auf der nächsten Stufe erfolgte problemlos die Schützung des Alkohols mit TBDMS-OTf zu Verbindung **rac-58a/58b** (siehe Abbildung 91) mit dem Hintergrund, dass bei der Eliminierung des Vinylbromids zum Alkin durch tBu-OK zunächst der Alkohol deprotoniert werden könnte, was die benötigte Menge an Base zum einen verdoppeln würde. Zum anderen verblieben Alkoholate in der Reaktionslösung, welche sich potenziell an die neu gebildete Dreifachbindung unter Auflösung der Ringspannung addieren könnten. Die TBDMS-Gruppe verhindert die Bildung produktbasierter Alkoholate und schirmt die Dreifachbindung vor freiem tBu-OK sterisch ab, was vermutlich den nukleophilen Angriff verhindert.

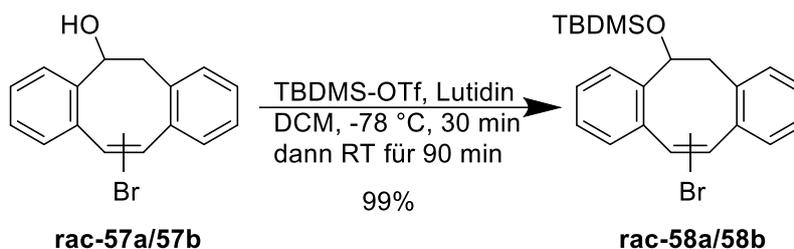


Abbildung 91: Darstellung von Verbindung **rac-58a/58b**.

Der Austausch von *t*Bu–OK gegen LDA böte gemäß Mbua *et al.*²⁷⁸ den Vorteil eines Verzichts der Schutzgruppe, gleichzeitig würde dies die Ausbeute deutlich reduzieren, weswegen man sich für die längere auf *t*Bu–OK basierende Variante entschied. Die sich anschließende Eliminierung des Vinylbromid zum Alkin blieb jedoch deutlich hinter den Erwartungen zurück (siehe Abbildung 92). Anders als die von Kornmeyer *et al.*²⁷⁶ publizierten 83% konnten hier nur 55% erzielt werden, sodass man sich auf dem Niveau der Eliminierung ohne Schutzgruppe befindet²⁷⁸, wodurch der Vorteil der längeren Synthese verfällt. Auffällig ist zudem, dass die typische IR–Bande von Alkinen um 2200 cm^{-1} anders als beschrieben nicht zu finden ist. Nach der Abspaltung der Schutzgruppe wird die Alkinbande auch in der Literatur nicht mehr aufgeführt. In den Massenspektren konnte die gesuchte Masse wie bei den zuvor beschriebenen Verbindungen nicht gefunden werden.

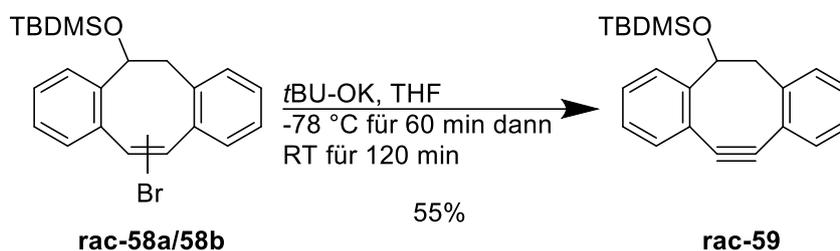


Abbildung 92: Baseninduzierte Eliminierung des Vinylbromids **rac-58a/58b** zum entsprechenden Alkin **rac-59**.

Die NMR–Daten stimmen jedoch mit den publizierten Daten überein, weswegen an dieser Stelle von einem Erfolg der Synthese ausgegangen wurde. Der letzte Schritt bevor der Linker mit dem Label verknüpft wurde, ist das Entfernen der Schutzgruppe. Zwei unterschiedliche Bedingungen wurden hierbei getestet: Eine wasserfreie Variante, in welcher eine 2 M TBAF–Lösung zum Einsatz kam und eine auf Basis des TBAF–Trihydrats. Erwartungsgemäß führte die Verwendung von wasserfreiem TBAF zum kompletten Verlust des eingesetzten Eduktes. Analog zu den CEM–Entschützungen agiert das Fluorid in einer wasserfreien Umgebung möglicherweise als potentes Nukleophil. Leider ließ sich auch hier kein einheitliches Produkt isolieren, um sich den mechanistischen Ablauf erschließen zu können. Die Verwendung des Trihydrats auf der anderen Seite führt zu einer sauberen Umsetzung des Alkins, welche über Elementaranalyse und NMR bestätigt wurde (siehe Abbildung 93).

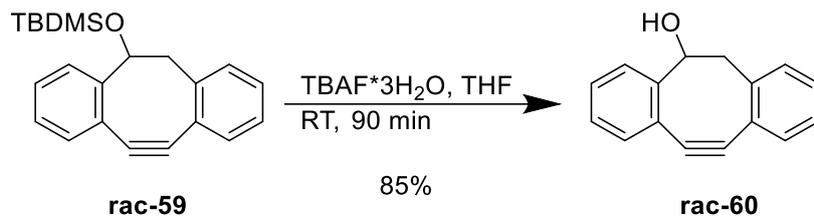


Abbildung 93: TBDMS-Entschützung von **rac-59** mit dem TBAF-Trihydrat zum freien Alkohol **rac-60**.

Da die zweite Eliminierung von Hydrobromid nicht die gewünschten Ergebnisse lieferte, wurde auch die schutzgruppenfreie Methode von Mbu *et al.*²⁷⁸ verwendet. Ausgehend von Verbindung **rac-57a/57b** wird diese sofort mit LDA umgesetzt. Hierbei konnten erheblich höhere Ausbeuten erzielt werden als angenommen, nämlich 79% im Vergleich zu den publizierten 57% (siehe Abbildung 94). Wobei es sich bei der veröffentlichten Methode um eine doppelte Eliminierung, also die direkte Umsetzung vom 1,2-Dibromalkan zum Alkin handelt. Die Bildung des Alkins konnte zusätzlich zu den übereinstimmenden NMR-Daten und Elementaranalyse über eine erfolgreiche Umsetzung mit Natriumazid nachgewiesen werden.

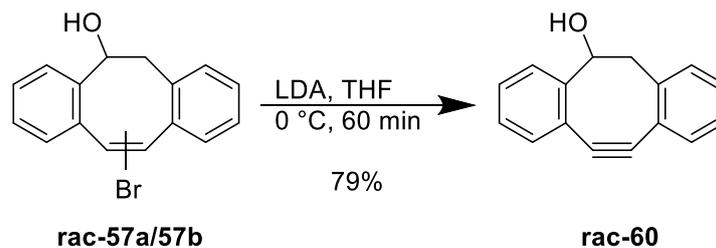


Abbildung 94: Schutzgruppenfreie Eliminierung von Hydrobromid mittels LDA.

Im letzten Schritt konnte das Cyclooctin und die Carbonsäure **61** über eine Steglichveresterung in ausgezeichneten Ausbeuten miteinander verknüpft werden (siehe Abbildung 95). Abschließend wurde die EPR-Aktivität über eine cw-Messung verifiziert (siehe Abbildung 96). Da es sich um ein ausgesprochen lipophiles Molekül handelt, wurde es zunächst in Acetonitril gelöst und mit dem Bestrahlungspuffer auf ein Verhältnis von 1:1 verdünnt.

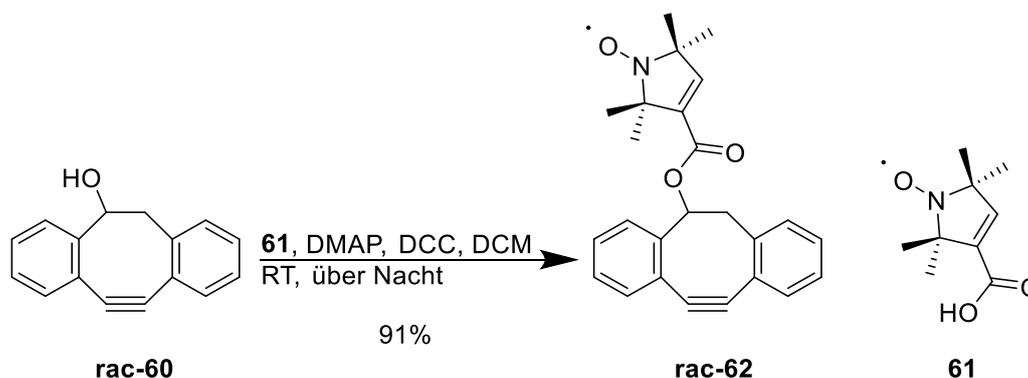


Abbildung 95: Verknüpfung des Linkers mit dem TPA-Spinlabel über eine Steglichveresterung.

Analog zu dem Lysinderivat **51** erhält man dadurch, dass hier ein kleines Molekül untersucht wird, welches schnelle Orientierungsänderungen durchlaufen kann, gleich hohe und schmale Absorptionsbanden.

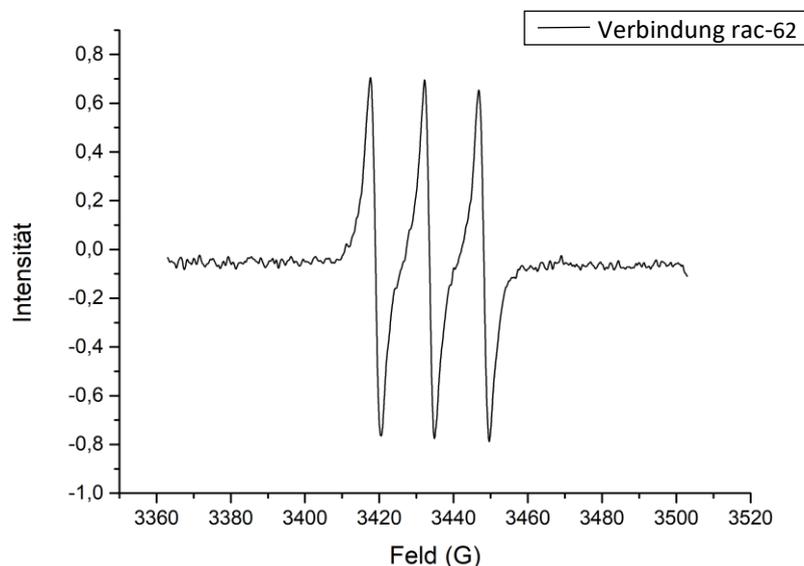


Abbildung 96: cw-Messung von Verbindung **rac-62**.

Zusammenfassung und Ausblick. Ausgehend von Suberenon **53** gelang es durch Kombination zweier unterschiedlicher Synthesewege eine verbesserte Variante zu etablieren, die über sechs Stufen eine Gesamtausbeute von über 42% lieferte. Die beiden Schlüsselschritte in Form der Wolff-artigen Umlagerung und die schutzgruppenfreie Eliminierung des Hydrobromids funktionierten hierbei hervorragend, insbesondere die Eliminierung zum Alkin gelang deutlich besser als erwartet. Die Gefahr eines inter- bzw. intramolekularen Angriffs durch das freie Alkoholat hat sich unter den gewählten Bedingungen nicht realisiert. Möglicherweise ist aus Gründen der Molekülgeometrie ein solcher Angriff ausgeschlossen. In diesem Beispiel wurde der Spinlabel über einen Ester an den Linker gekuppelt, welcher zwar weniger flexibel als der ursprüngliche Ether ist aber dennoch weiteres Optimierungspotential birgt, da für EPR-Messungen Linker und Marker sowie deren Verknüpfung möglichst starr sein sollte. Alternativ könnte man sich den Doppelbindungscharakter einer Amidbindung und die damit einhergehenden Einschränkung der Rotation um die Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung zu Nutze machen. Hierzu müsste der Alkohol durch ein Amin ersetzt werden (siehe Abbildung 97A).

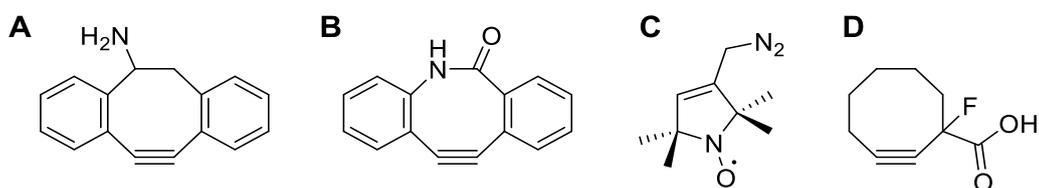


Abbildung 97: Alternativstrukturen für weiterführende Experimente bei den „clickbaren“ Spinlabeln.

Dies könnte beispielsweise auf der Stufe des Ketons **56a/56b** durch reduktive Aminierung geschehen. Weitere Ideen für eine möglichst starre oder kurze Verknüpfung zwischen Linker und Spinlabel könnte die Verwendung eines heterozyklischen Achtrings (siehe Abbildung 97B) sein oder die Verwendung einer Diazoverbindung, welche bereits den Spinlabel trägt und über die Umlagerung dieser direkt mit dem Ringsystem verbunden wäre (siehe Abbildung 97C). Sollten die benzanellierten Systeme sterisch zu anspruchsvoll sein, so böte sich die Verwendung einfacher Cyclooctine an, die über Elektronenakzeptoren in α -Position ihre Reaktivität steigern (siehe Abbildung 97D)²⁷⁴.

3.2.3 Geschütztes Phenylalaninderivat

Die Nützlichkeit von Spinlabeln in der Abstandsbestimmung hängt zu großen Teilen davon ab, dass die Label die natürliche Faltung des Zielmoleküls weitestgehend unbeeinflusst lassen, und Bewegungen, welche unabhängig vom Protein oder der Nukleinsäure möglich sind, verhindert werden, um eine präzise Abstandsverteilung zu erhalten. Durch minimalinvasive Eingriffe in bereits vorhandene Strukturelemente soll dies gewährleistet werden. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf das Phenylalanin. Die Idee ist es den Phenylring durch einen photolabil geschützten Tetramethylisoindolinlabel zu ersetzen. Der Label würde die Struktur nur um den zusätzlichen Fünfring erweitern, der das Radikal beinhaltet. Anders als das Lysinderivat, welches ribosomal eingebaut werden soll, ist bei dem Phenylalaninderivat das Ziel dieses mittels Festphasensynthese einzubauen. Dies macht zwangsläufig eine Schutzgruppe am Radikal erforderlich, da unter den vorherrschenden Bedingungen eine Zersetzung des Radikals nicht vermieden werden könnte. Das Phenylalanin wurde bereits in vielen Publikationen als Ziel für Modifikationen ausgewählt. Hierbei wird der Label aber stets postsynthetisch und nicht direkt an den Phenylring selbst angebracht, sondern über funktionelle Gruppen wie Alkin²¹⁴, Acetyl²¹³, Halogen²⁷⁹ oder Azid²¹⁴. Lediglich Kálai *et al.* publizierten im Jahre 2008 eine entsprechende racemische Synthese.²⁸⁰ In diesem Fall soll die Synthese jedoch stereospezifisch erfolgen und die Aminosäure wegen der Schutzgruppe auch für den automatisierten Aufbau von Peptiden verwendbar sein. Der Schlüsselschritt wird hierbei der Aufbau des Stereozentrums in α -Position sein. Es gibt zahlreiche Methoden, über die sich durch Alkylierung Stereozentren an Aminosäuren aufbauen lassen. Die Wahl viel zunächst auf die Phasentransferkatalyse und speziell auf einen Maruoka-Phasentransferkatalysator, welcher die Stereoinformation übertragen soll und in seiner jetzigen Form sehr gute Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse ermöglicht.^{281,282}

Syntheseplanung. Ausgehend von 4-Methylphthalsäureanhydrid (**63**) erfolgt zunächst die Umsetzung mit Benzylamin über eine Kondensation zu Verbindung **64**, gefolgt von einer vierfachen Methylierung mittels Methylgrignard unter Bildung des Tetramethylisoindolingerüsts. Nach hydrogenolytischer Spaltung des Benzylamins zu **66** und anschließender Oxidation mit *m*CPBA zu Verbindung **67** wird diese

reduktiv in das Hydroxylamin überführt und mit Acetylchlorid zu Verbindung **68** umgesetzt. Diese Schritte sind bereits literaturbekannt und im Multigrammmaßstab beschrieben.²⁸³ Durch eine radikalische Bromierung an der Methylgruppe des Aromaten sollte sich Verbindung **68** zu **69** umsetzen lassen, welche dann mit Hilfe eines Maruoka-Phasentransferkatalysator in einer enantioselektiv gesteuerten Alkylierung mit einem ebenfalls herzustellenden O'Donnell-Imin **72** zu Verbindung **73** umzusetzen wäre. Nach Hydrolyse des Imins zu **74** schließt sich die Fmoc-Schätzung des freien Amins zu **75** an. Durch reduktive Acylierung mit dem Chlorkohlensäureester des 2-Nitrobenzylalkohols und säureinduzierter Spaltung des Butylester soll Verbindung **76** erhalten werden. Die Verwendung der NBOM-Gruppe ist an dieser Stelle nicht möglich, da am Ende der Festphasensynthese das Peptid mit TFA vom Träger abgespalten wird. Die Syntheseroute ist in Abbildung 98 gezeigt.

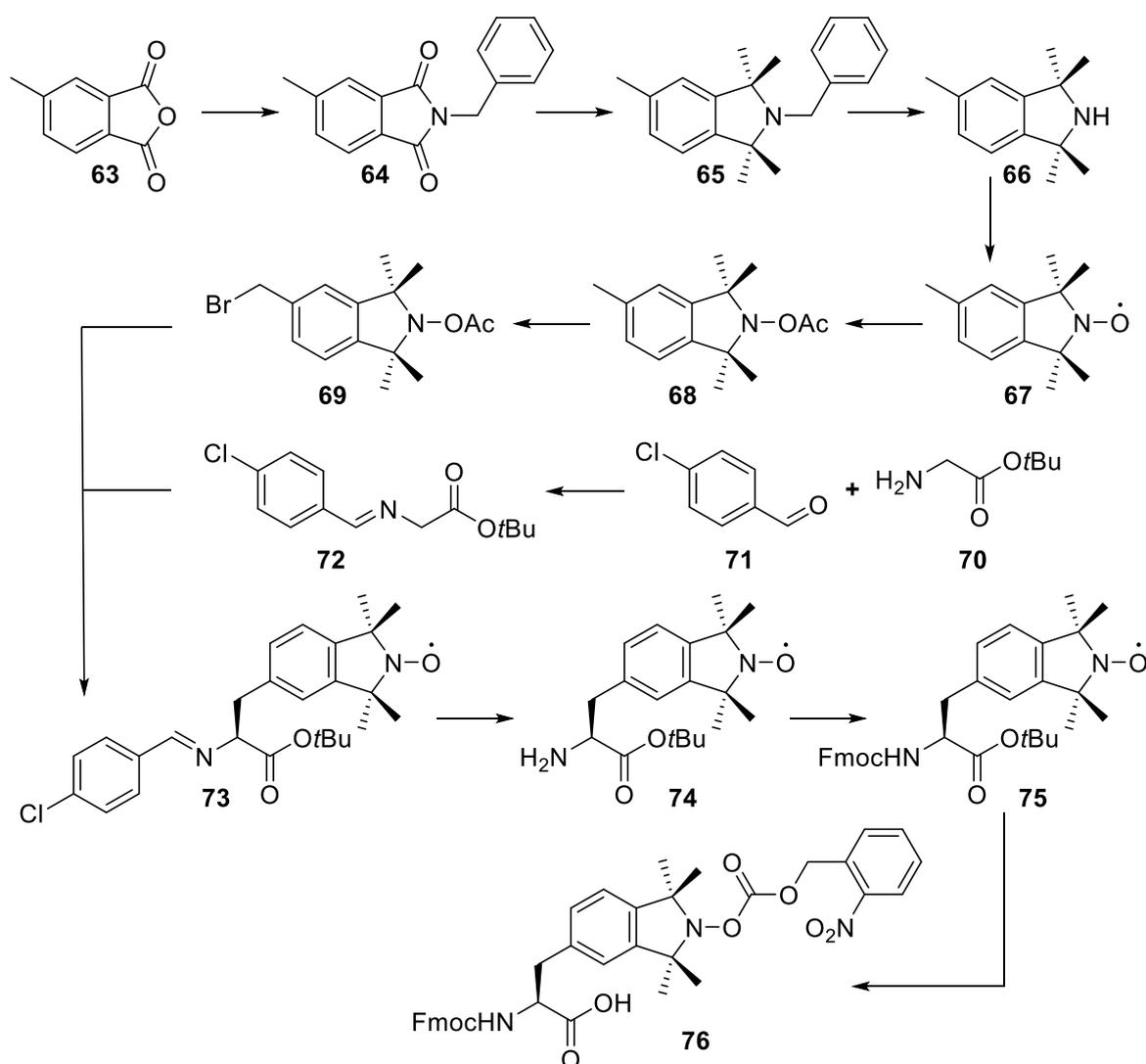


Abbildung 98: Syntheseroute zur Darstellung eines Phenylalaninderivates mit Tetramethylisindolinspinlabel über eine stereoselektive Phasentransferreaktion.

Darstellung des Tetraisoindolinspinlabels. Beginnend mit der Kondensation von Benzylamin und 4-Methylphthalensäureanhydrid (**63**) ließ sich das 4-Methyl-N-benzylphthalimid (**64**) problemlos und in beinahe quantitativer Ausbeute isolieren (siehe Abbildung 99). Die typische Ansatzgröße betrug zwischen 50 und 75 g, da im darauffolgenden Schritt, der Grignard-Reaktion, nur unterdurchschnittliche Ausbeuten zu erzielen sind und deswegen ein größerer Maßstab erforderlich war.

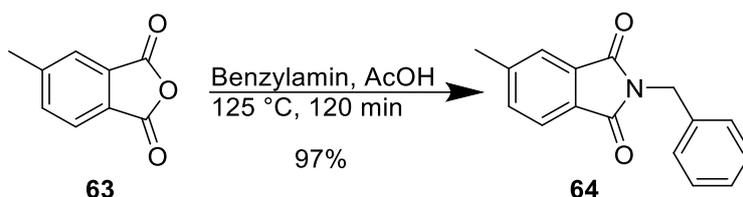


Abbildung 99: Synthese von Verbindung **64** über eine Kondensation mit Benzylamin.

Bei dem darauffolgenden Schritt wurden mittels Grignard-Reaktion die zwei Carbonylgruppen von **64** jeweils durch zwei Methylgruppen substituiert (siehe Abbildung 100). Wie bereits erwähnt, stabilisieren diese den später einzuführenden Nitroxidspinlabel. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen, sollten die Ansatzgrößen nicht die Grenze von 15 g des Phthalimids überschreiten, da die Verwendung größerer Mengen zu Ausbeutenverlust führen. Standardmäßig werden sowohl die Bildung des Grignard-Reagenz als auch die eigentliche Reaktion in Ethern durchgeführt. Vorausgehende Arbeiten zeigten, dass ein Wechsel des Lösungsmittel nach Bildung des Reagenzes zu einem mit höherem Siedepunkt zu verbesserten Ausbeuten führt.¹⁷⁷ So war es möglich, durch den Wechsel des Lösungsmittels von Diethylether zu Toluol durch eine Dean-Stark-Apparatur, die Ausbeuten um 20% zu steigern. Die über die Erhöhung der Temperatur gesteigerte Ausbeute lässt sich wohl so deuten, dass mit dem Einführen der zweiten Methylgruppe formal ein O^{2-} -Anion eliminiert werden würde. Die Eliminierung des Dianions erscheint unter normalen Umständen energetisch unmöglich, kann in diesem Fall aber durch den Einbau in das Gitter des sich bildenden Magnesiumoxids kompensiert werden. Die Zugabe eines zu großen Überschusses an Iodmethan sollte vermieden werden, da hierbei bereits die Bildung einzelner Ethylgruppen im Produkt festzustellen war. Dies trat vor allem dann auf, wenn mehr Iodmethan als Magnesium verwendet wurde.

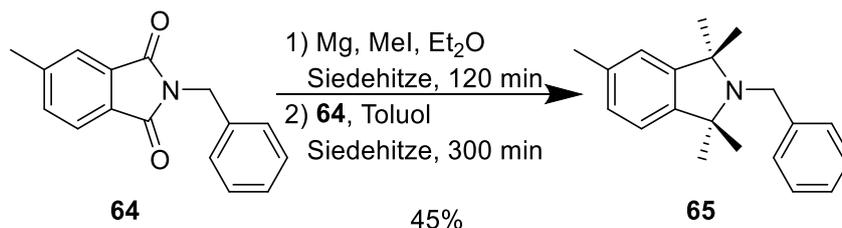


Abbildung 100: Einführung der vier Methylgruppen zur Stabilisierung des späteren Radikals mittels Grignard-Reaktion.

Durch anschließende Hydrierung von Verbindung **65** mit Pd/C und Wasserstoff konnte die Benzylgruppe in ausgezeichneten Ausbeuten abgespalten und Amin **66** freigesetzt werden (siehe Abbildung 101). Da es sich um eine Oberflächenreaktion zwischen dem suspendierten Feststoff und dem gasförmigen Wasserstoff handelt, ist eine starke und stetige Durchmischung unbedingt erforderlich. Durch die Oxidation desamins mit *m*CPBA konnte erneut in ausgezeichneten Ausbeuten das Nitroxidradikal **67** synthetisiert werden (siehe Abbildung 101).

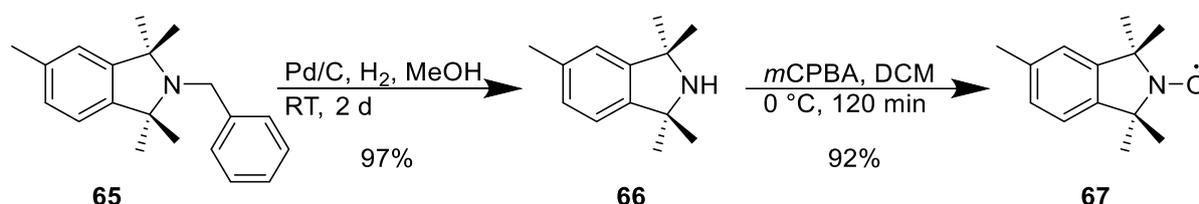


Abbildung 101: Synthese des Nitroxidradikals **67** über das freie Amin **66** ausgehend vom benzylierten Amin **65**.

Da ein paramagnetisches Zentrum zum einen die Analyse mittels NMR erschwert und nur durch eine Reduktion des Radikals umgangen werden kann und zum anderen die Bromierung der benzylierten Methylgruppe radikalisch erfolgt, was im Reaktionsverlauf zu Problemen führen könnte, wurde das Radikal temporär mit einer Acetylgruppe geschützt. Hierzu wurde das Radikal zunächst zum Hydroxylamin reduziert und dann mit Acetylchlorid umgesetzt. (siehe Abbildung 102).

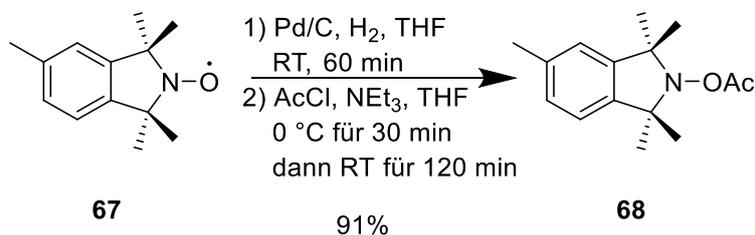


Abbildung 102: Darstellung von Verbindung **68** ausgehend vom Nitroxidradikal **67**.

Der letzte Schritt bevor der Spinlabel mit dem Rückgrat der Aminosäure verknüpft werden konnte, war die radikalische Bromierung der benzylierten Methylgruppe (siehe Abbildung 103). Anders als zuerst angenommen, erforderte die Reaktion viel Optimierungsbedarf. Erste Versuche, in welchen die Bromierung bei normalen Lichtverhältnissen in Acetonitril durchgeführt wurden, misslangen unter Zersetzung des Ausgangsmaterials.

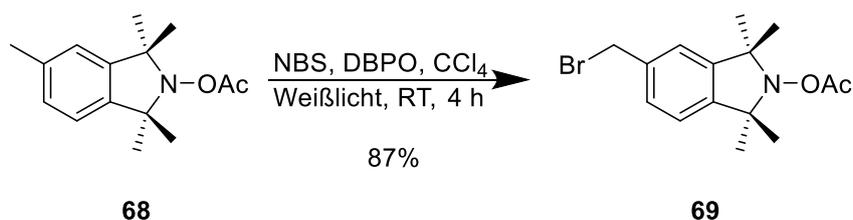


Abbildung 103: Radikalische Bromierung von Verbindung **68**.

Dass Acetonitril zur Zersetzung des Eduktes führt, ist ungewöhnlich viele andere Publikationen verwenden dieses als Lösungsmittel für ihre radikalischen Bromierungen zumeist mit sehr guten Ergebnissen. Durch den Austausch des Acetonitrils gegen den giftigeren Tetrachlorkohlenstoff und die Verwendung einer UV-Lampe, die typischerweise für die Begutachtung von DCs verwendet wird, konnte erstmals die bromierte Spezies **69** in schlechten Ausbeuten gemäß Combes *et al.*²⁸⁴ isoliert werden. Das gleiche Experiment ohne die gesonderte Bestrahlung führte erneut zu keiner Reaktion, diesmal jedoch ohne Verlust des Eduktes. Durch die Erhöhung der zugeführten Lichtintensität konnte die Ausbeute nochmals deutlich gesteigert werden. Man erhielt aber stets ein Gemisch aus Edukt und Produkt, das sich hinsichtlich seiner Laufeigenschaften nicht ausreichend unterschied, aber durch Umkristallisation zu trennen war.

Das O'Donnell-Imin **72**, welches das Rückgrat der Aminosäure bildet, wurde in einer Kondensation zwischen dem *tert*-Butylester des Glycins **70** und dem 4-Chlorbenzaldehyd (**71**) in sehr guten Ausbeuten (siehe Abbildung 104) hergestellt.

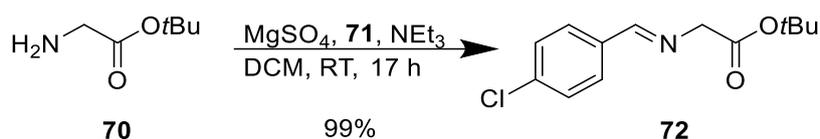


Abbildung 104: Synthese des O'Donnell-Imin **72**.

Den Schlüsselschritt der Synthese bildet die stereospezifische Verknüpfung zwischen dem O'Donnell-Imin **72** und dem Spinlabelbaustein **69** über eine Phasentransferkatalyse mit einem Maruoka-Katalysator deren Prinzip in Abbildung 105 gezeigt ist.

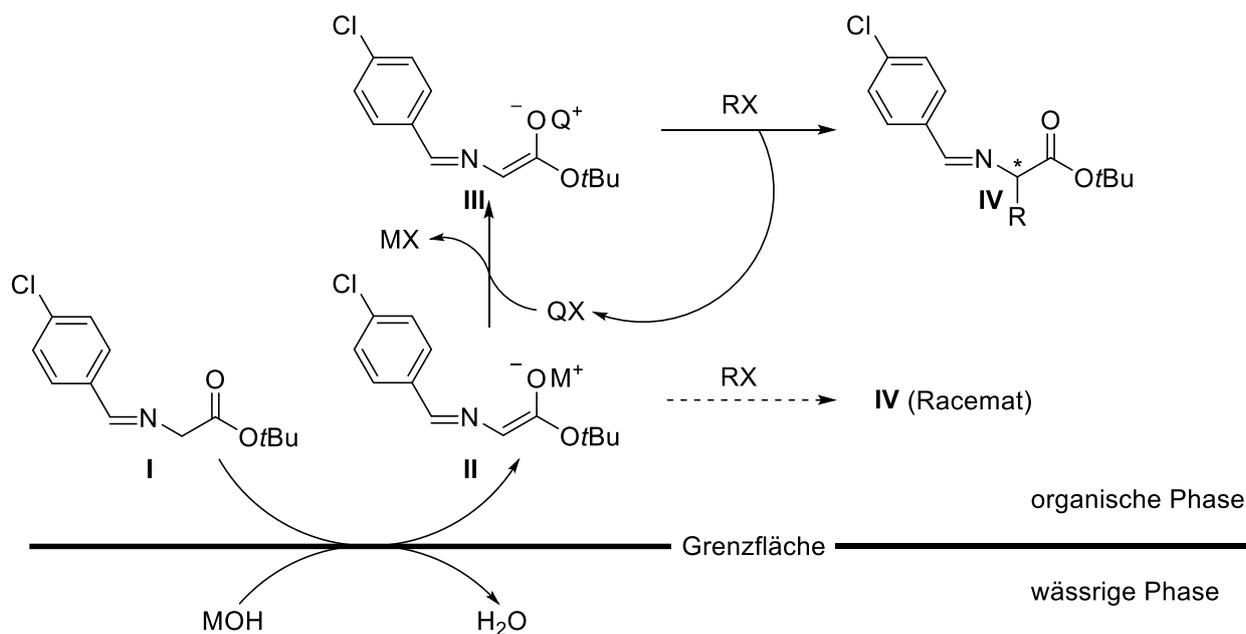


Abbildung 105: Prinzip einer asymmetrischen Alkylierung aktiver Methylenverbindungen mittels Phasentransferkatalyse am Beispiel einer Glycin-Schiff-Base. Die Abbildung ist entlehnt aus [282].

Im ersten Schritt der Alkylierung erfolgt die die Abspaltung eines α -Protons von **I** durch die Base MOH unter Bildung des entsprechenden Enolats **II**, welches an der Grenzfläche zwischen den beiden Phasen verbleibt. Durch den Austausch des Metallkations gegen den chiralen Katalysator wird das lipophile und chirale Oniumenolat **III** gebildet. In dieser Form kann das Enolat sich von der Grenzflächenregion lösen und tiefer in die organische Phase eindringen, wo es mit dem Alkylhalogenid zum stereospezifischen Monoalkylierungsprodukt **IV** umgesetzt und der Katalysator gleichzeitig regeneriert wird. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist der schnelle Ionenaustausch zwischen dem Metall und dem chiralen Katalysator, sodass sich die reaktive Spezies **III** bilden kann und eine der beiden enantiotopen Seiten wirksam abgeschirmt wird. Ansonst kommt es zur Bildung eines racemischen Gemisches.²⁸²

In Vorversuchen, in welchen das O'Donnell-Imin mit Benzylbromid umgesetzt wurde, konnte das Alkylierungsprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Sobald das Benzylbromid jedoch mit dem Baustein **69** ersetzt wurde, konnte keine Reaktion mehr beobachtet werden. Lediglich die zunehmende Hydrolyse der beiden Bausteine wurde mit zunehmender Reaktionsdauer festgestellt. Verschiedene Ansätze mit sich unterscheidenden Konzentrationen an Katalysator führten zu keinem abweichenden Ergebnis. Warum an dieser Stelle keine Alkylierung zu beobachten war bleibt ungeklärt. Möglicherweise ist der einzufügende Rest zu groß gewesen. Vielleicht reagiert N-O-Ac aber auch mit dem Enolat in einer Esterkondensation unter Freisetzung des Radikals. Den Vorläufer **66** zu bromieren und das Amin erst nach der Kupplung zu oxidieren könnte sich als gangbare Alternative erweisen.

Da mit der Phasentransferkatalyse die Kupplung zwischen den beiden Bausteinen nicht gelang, wurde die Myers-Alkylierung als Alternative für die Kupplung von Baustein **69** getestet. Die Alkylierung nach Myers verwendet ein chirales Auxiliär, welches in einer vorgelagerten Stufe eingebaut wird, um eine

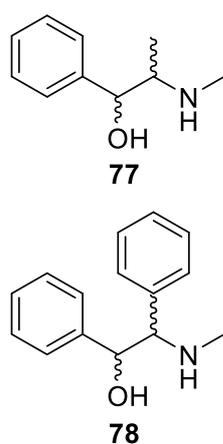


Abbildung 106: Strukturen der Myers-Auxiliäre Pseudoephedrin (**77**) und Pseudoephamin (**78**).

nach Mellem *et al.*²⁸⁵ in einer einfachen dreistufigen Synthese aus Benzil darstellen lassen. Das

asymmetrische Induktion der gewünschten Konfiguration hervorzurufen. Das typischerweise verwendete Reagenz ist ein Pseudoephedrin (**77**) gewünschter Konfiguration, welches bereits selbst pharmakologisch aktiv ist und auf Dopinglisten zu finden war bzw. ist. Jedoch lässt sich durch katalytische Hydrierung die benzyliche Hydroxylgruppe entfernen, um Methamphetamin besser bekannt als Crystal Meth, eine Droge mit hohem Suchtpotential zu synthetisieren. Aus diesem Grund sind die Ausgangsstoffe und das Auxiliär selbst stark reguliert. Eine weniger kritische Variante des Pseudoephedrins ist das Pseudoephamin (**78**). Hierbei ist die Methylgruppe durch einen Phenylring ersetzt worden und sollte sich

bromierte Tetraisoindolin **69** kann nach wie vor in diesem Syntheseweg eingesetzt werden lediglich der Kupplungspartner muss angepasst werden. Nachteilig beim Pseudoephenamin ist der hohe Anschaffungspreis, welcher in Kombination mit dem intrinsischen Problem von Auxiliaren, dass diese equimolar eingesetzt werden müssen, dazu führte, dass dieses selbst synthetisiert werden sollte.

Syntheseplanung. Ausgehend von Benzil (**79**) erfolgt zunächst die Umsetzung mit Methylamin zum Methyliminobenzil (**80**). Anschließend müssen die Keto- und Iminofunktion reduziert werden. Da dieser Schritt unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht stereospezifisch ablaufen kann, müssen die Stereoisomere durch Kristallisation mit einem chiralen Hilfsstoff voneinander getrennt werden. Durch den Einsatz von von R- oder S-Mandelsäure sind beide Enantiomere (S,S bzw. R,R) des Pseudoephenamins zugänglich. Die Diastereomere sind wenig interessant und können nicht zur asymmetrischen Induktion verwendet werden. Für die Darstellung von L-Aminosäuren ist das R,R-Enantiomer vonnöten.²⁸⁶ Das Mandelat **82** wird nun durch Zugabe von NaOH in die freie Base **83** überführt und bildet nach der Umsetzung mit Boc-Glycin (**84**) den Kupplungspartner **85** für den Tetraisoindolinspinlabel **69**. Nach Kupplung der beiden Bausteine zum Phenylalaninderivat **86**, erfolgt die Spaltung des Auxiliars und der Schutzgruppen sowie die darauffolgende Schützung von Amin und Radikal. Die geplante Synthese ist in Abbildung 107 gezeigt.

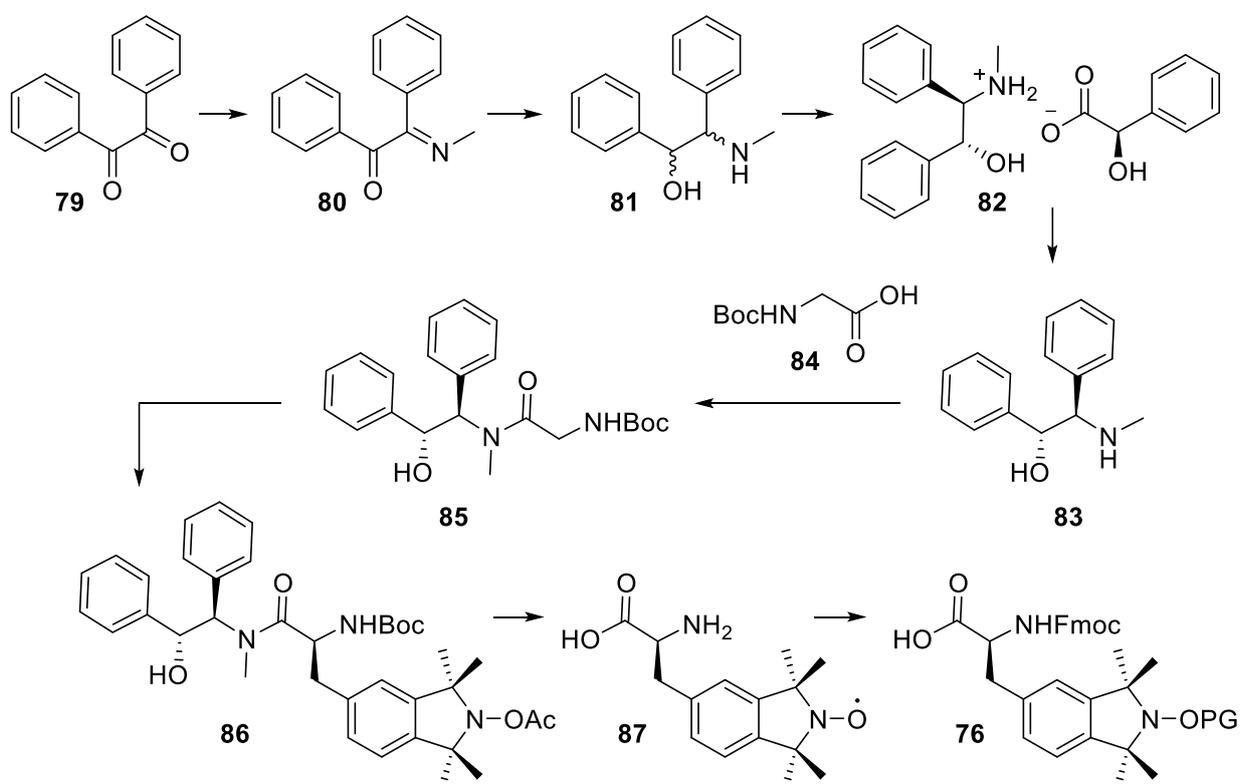


Abbildung 107: Geplante Syntheseroute zur Darstellung eine Phenylalaninderivates mit Tetramethylisoindolinspinlabel über eine Myers-Alkylierung.

Synthese des chiralen Auxiliars. Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung von Benzil (**79**) mit Methylamin zu Verbindung **80**. Die Reaktion verlief problemlos und das Produkt konnte nach der Umkristallisation in ausgezeichneten Ausbeuten erhalten werden (siehe Abbildung 108).

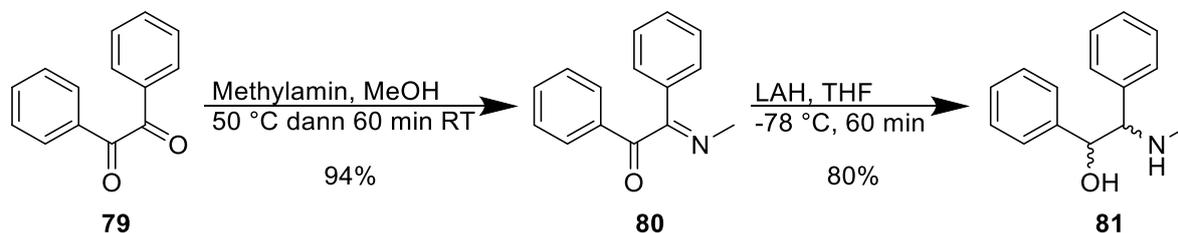


Abbildung 108: Synthese des Methyliminobenzils (**80**) ausgehend von Benzil (**79**) mit anschließender Reduktion zu Verbindung **81**.

Durch Reduktion der beiden elektrophilen Positionen mit LAH konnte dann Verbindung **80** in **81** umgewandelt werden (siehe Abbildung 108). Neben LAH wurden auch Natriumborhydrid und eine Luche-Reduktion versucht, um das Diastereomenverhältnis zwischen R,R/S,S und S,R/R,S zu Gunsten des erstgenannten Enantiomerenpaares zu verschieben. LAH, welches bereits Mellem *et al.* verwendet worden ist, liefert mit 4.5:1 dr das beste Verhältnis wohingegen die anderen Reaktionen sogar die entgegengesetzten Diastereomeren bevorzugten (siehe Tabelle 4). Das Diastereomenverhältnis deckt sich mit den publizierten Daten.

Tabelle 4: Einfluss unterschiedlicher Reduktionen auf das Diastereomenverhältnis von Verbindung **81**.

Reduktionsmittel	Ausbeute [%]	Diastereomenverhältnis
LAH	80	4.5:1
NaBH ₄	95	1:1.5
NaBH ₄ + CeCl ₃	73	1:2.2

Im nächsten Schritt sollte das Stereomergemisch über die Bildung eines Salzes mit Mandelsäure auskristallisiert werden (siehe Abbildung 109). Entsprechend der Publikation wurden Ausgangsmaterial und Mandelsäure in Methanol gelöst und bei 4 °C gelagert.²⁸⁵ Auf diese Weise konnten jedoch keine Mandelate erhalten werden, auch nach zwei Wochen kam es nicht zur Kristallisation der Probe. Durch Zugabe von Diethylether konnte schließlich die Kristallisation eingeleitet werden, dies resultierte jedoch nur in einem 1:1 dr-Verhältnis.

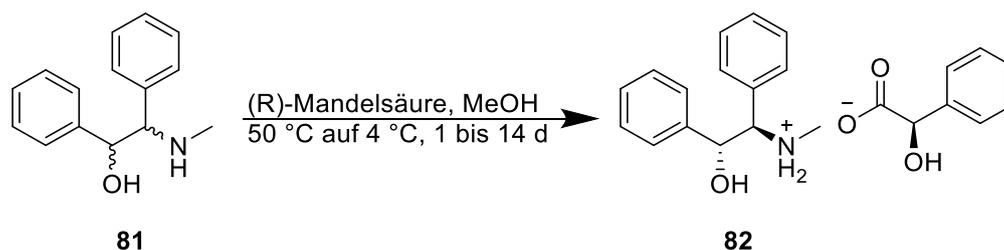


Abbildung 109: Trennung des Stereomergemischs durch Kristallisation mit Mandelsäure.

In einer Testreihe wurden dann unterschiedliche Kristallisationsbedingungen getestet, um die publizierten Verhältnisse von >19:1 dr zu erzielen (siehe Tabelle 5). Vornehmlich wurden die Lösungsmittelvolumina variiert aber auch Menge an Mandelsäure und Temperatur.

Tabelle 5: Kristallisationsbedingungen für Verbindung **81** mit (R)-Mandelsäure.

Auxiliar [g]	Mandelsäure [g]	Methanol [mL]	Diethylether [mL]	Temperatur [°C]	dr
0.5	0.34	1	5	4	1:1
0.5	0.34	1	6	4	1:1
0.5	0.34	1	7	4	1:1
0.5	0.34	1	8	4	1:1
0.5	0.34	1	9	4	1:1
0.5	0.34	1	10	4	1:1
0.5	0.34	1	5	-40	1:1
0.5	0.34	0.5	2.5	4	1:1
0.5	0.34	0.6	0	4	14:1
0.5	0.34	0.7	0	4	–
0.5	0.34	0.8	0	4	–
0.5	0.34	0.9	0	4	–
0.5	0.17	1	0	4	–

Als erstes stechen die immer gleich schlechten Ergebnisse der Kristallisation mit Diethylether ins Auge. Der Diethylether fördert zwar die Kristallisation, sorgt im Gegenzug aber dafür, dass die erhaltenen Kristalle einen unzureichenden dr aufweisen. Auf der anderen Seite konnte durch die Variation an eingesetztem Methanol die Kristallisation ohne die Hilfe von Diethylether erreicht werden. Das beste Ergebnis, welches erhalten werden konnte, war ein dr von 14:1, was für eine stereoselektive Synthese noch nicht ausreichend ist. Die Hoffnung, mit den 14:1-Kristallen weitere Kristallisationen anzupfen zu können und dadurch eine weitere Verbesserung der Reinheit zu erzielen, erfüllte sich leider nicht. An dieser Stelle wurde die Synthese des Pseudoephensamins wegen des immer größer werdenden zeitlichen Aufwands abgebrochen, stattdessen kam das klassische Pseudoephedrin zum Einsatz. Zwar unterliegt die Verwendung strengen Richtlinien, muss aber anders als das Pseudoephensamin nicht synthetisiert werden, sondern kann kommerziell erworben werden. Die Synthese ändert sich durch den Wechsel des chiralen Auxiliars nicht bzw. nur geringfügig in Bezug auf die Aminogruppe (geschützt/nicht geschützt).

Darstellung des Phenylalaninderivats. Zwar führt die Verwendung des (S,S)-Isomers zur Bildung von D-Aminosäuren, jedoch waren zu diesem Zeitpunkt dessen Preis deutlich günstiger und die kleinste Gebindegröße für Machbarkeitsstudien ideal. So wurde sich dafür entschieden, die Alkylierung

zunächst mit der enantiomeren Verbindung zu versuchen, zumal D-Aminosäuren an sich nicht uninteressant sind. Der Startpunkt der Synthese bildet somit die Umsetzung von Boc-Glycin (**84**) mit (S,S)-(+)-Pseudoephedrin zum Carbonsäureamid **90** (siehe Abbildung 110). Die Reaktion verläuft über die Bildung eines Aktivesters als Zwischenstufe **88**, um die Carbonsäure zu aktivieren. Hierfür muss die Aminogruppe geschützt vorliegen, um die Bildung eines Carbonsäureamids an der falschen Stelle zu verhindern, weswegen Boc-Glycin eingesetzt worden ist. Zuletzt konnte durch Salzsäure die Boc-Gruppe abgespalten und das Pseudoephedrin-Glycinamid **90** als farblose Kristalle isoliert werden. Wegen verschiedener energieminimierter Konformationen, welche durch die eingeschränkte Rotation um die Amidbindung hervorgerufen werden, und axialer Chiralität sind die erhaltenen NMR-Spektren komplex und eine Auswertung erschwert.

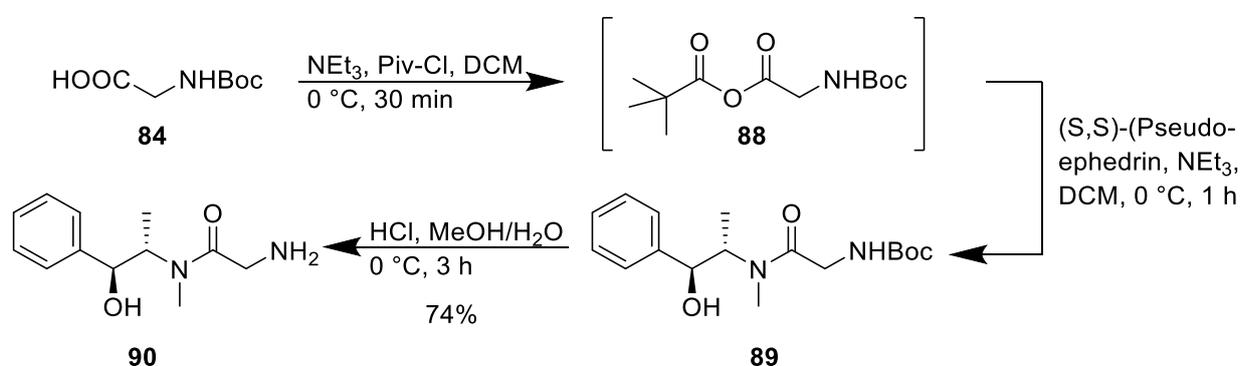


Abbildung 110: Synthese von (S,S)-(+)-Pseudoephedrin-Glycinamid (**90**).

Durch Deprotonierung mittels einer starken und sterisch anspruchsvollen Base muss zunächst Verbindung **90** in ihr entsprechendes Enolat **92** überführt werden, um sie dann mit dem bromierten Tetraisoindolinlabel **69** umsetzen zu können. Trotz der drei unterschiedlich aziden Positionen im Molekül (Hydroxyl-Gruppe, α -Kohlenstoffatom und Aminogruppe) sollte aufgrund der deutlich reduzierten Azidität der Aminogruppe bei Verwendung von weniger als zwei Äquivalenten Base die Bildung des thermodynamisch stabilen *O,O*-(*Z*)-Enolat **92** bevorzugt stattfinden. Jedoch belegen experimentelle Befunde die bevorzugte kinetische Deprotonierung bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ von **90** und die Bildung eines *N,O*-Dianions **91** (siehe Abbildung 111).²⁸⁷ Erst die Erwärmung der Reaktionstemperatur von $-78\text{ }^\circ\text{C}$ auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ führt zur gewünschten Equilibrierung und zur Bildung des thermodynamisch bevorzugten Enolats **92**, welches anschließend am α -C-Atom alkyliert werden kann.

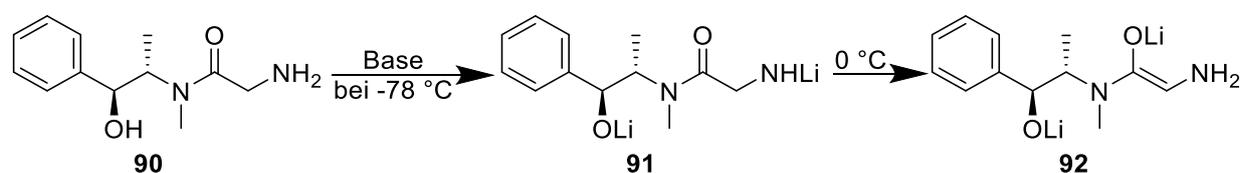


Abbildung 111: Deprotonierung von Verbindung **90** erzeugt das gewünschte Enolat **92** nach dem Equilibrieren bei $0\text{ }^\circ\text{C}$.

Da die in der Reaktion verwendete Base mit hoher Genauigkeit eingesetzt werden muss, ist eine vorherige Titration notwendig. Um die genaue Konzentration von *n*-Butyllithium zu bestimmen, wurde die Doppelte Titration nach Gilman verwendet. Die Lithiierung wurde zunächst mit LDA versucht und die Durchführung erfolgte bei allen Ansätzen analog. LDA wurde bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgelegt und das Alkylierungsmittel **69** bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugegeben (siehe Abbildung 112). Die Ansätze unterschieden sich hinsichtlich eingesetzter Äquivalente der Base und Bezugsquelle des Lösungsmittels (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Verschiedene Versuchsansätze der Deprotonierung von Pseudoephedrin-Glycinamid **90**. Gekauftes THF bezieht sich auf die Verwendung von über Molsieb gelagertem THF mit Septum. Absoluiertes THF kennzeichnet die vorherige Trocknung durch ein Natrium/Benzophenon-Gemisch.

	Lithierungsreagenz	Äquivalente	Lösungsmittel	Produkt
1	LDA in THF (gekauft)	3.1	THF (gekauft)	---
2	LDA in THF (selbst hergestellt)	1.95	THF (gekauft)	---
3	LDA in THF (selbst hergestellt)	3.1	THF (gekauft)	---
4	LDA in THF (selbst hergestellt)	3.1	THF (absoluiert)	---
5	LDA in THF (selbst hergestellt)	5.1	THF (absoluiert)	---

Im ersten Ansatz wurden ausschließlich gekaufte Reagenzien eingesetzt, um den synthetischen Aufwand zu reduzieren, da dies jedoch nicht funktionierte, wurden zunächst LDA und später auch das THF selbst hergestellt bzw. selbst absoluiert, um mögliche Fehlerquellen zu eliminieren. Auch die Anzahl der Äquivalente wurde variiert, ebenfalls ohne Erfolg. Mittels DC konnten nur die beiden Edukte nachgewiesen werden. Verena Ludwig beobachtete jedoch, dass das Pseudoephedrin-Glycinamid häufig als Hydrat vorliegt.²⁸⁸ Die Tatsache, dass bei einer Messung des Schmelzpunktes von **90** nicht die von Myers *et al.* angegeben $78\text{ bis }80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen wurden, sondern ein Schmelzbereich von $65\text{ bis }75\text{ }^{\circ}\text{C}$ beobachtet wurde, unterstützt die Vermutung, dass Verbindung **90** Wasser enthalten könnte. Demnach würde gelten, dass bei den Versuchsansätzen eins bis vier tendenziell zu wenig Base eingesetzt wurde und es dementsprechend zu keiner Enolatbildung **92** gekommen ist. Doch auch bei der Reaktion mit 5.1 Äquivalenten LDA wurde kein Produkt isoliert, sondern nach beendeter Reaktion erneut nur die Edukte **90** und **69** nachgewiesen.

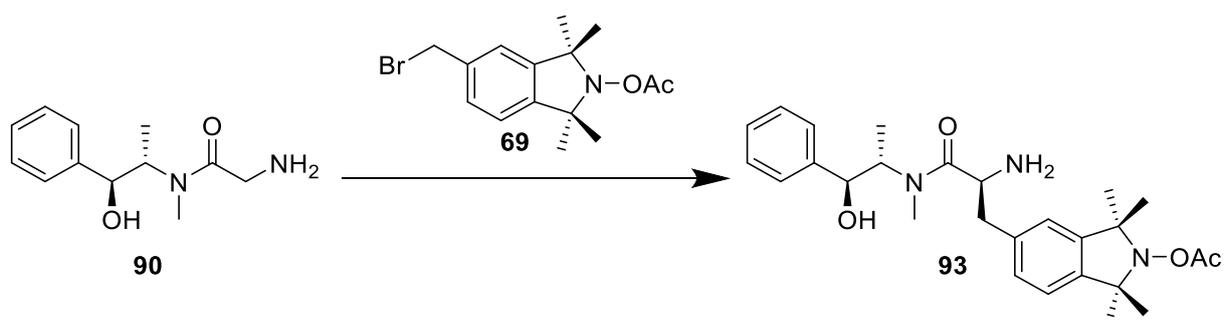


Abbildung 112: Versuchte Synthese eines Phenylalaninderivats **93** über eine Myers-Alkylierung.

Die gleichen Ergebnisse erhielt man auch bei Verwendung des Boc-geschützten Pseudoephedrin-Glycinamids **89**, welches gemäß Myers *et al.* ebenfalls eine geeignete Ausgangsverbindung für Alkylierungen ist. Das geschützte Derivat bietet den Vorteil risikolos sehr große Überschüsse an Base einsetzen zu können. Grund dafür ist die geringere Nukleophilie der NHBoc-Einheit in **89** im Vergleich zur Aminogruppe in Verbindung **90**. Zudem wird die Aminogruppe gemeinsam mit der Hydroxygruppe im Pseudoephedrin-Glycinamid **90** durch LDA zuerst deprotoniert, was die Nukleophilie und Basizität der Aminogruppe nochmals steigert. Es ist bekannt, dass die Verwendung großer Überschüsse an Base zur Nebenreaktion in Form eines basen-induzierten Glycin-Transfers gemäß Abbildung 113 führt.²⁸⁷ Diese Nebenreaktion konnte in diesem Fall bei der Verwendung von drei oder gar fünf Äquivalenten Base nicht beobachtet werden.

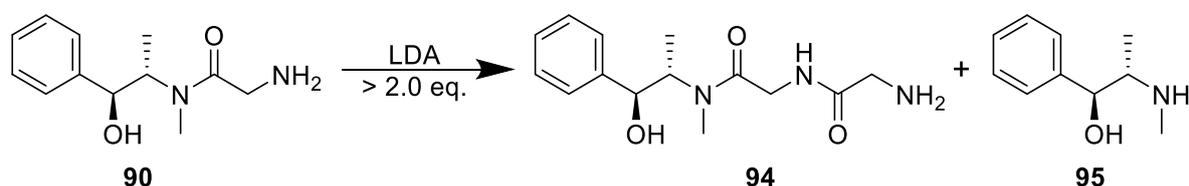


Abbildung 113: Nebenreaktion, der Myers Alkylierung von **90** bei Verwendung von mehr als 2.0 Äquivalenten LDA, welche zur Bildung von Pseudoephedrin-Glycylglycinamid (**94**) und Pseudoephedrin (**95**) führt.

Neben LDA wurde ebenfalls LiHMDS als Base eingesetzt, um das Enolat zu bilden. Zu Testzwecken wurde in einer Testreaktion Benzylbromid statt dem Tetraisoindolinlabel **69** eingesetzt. Erneut ließ sich analog zur Phasentransferkatalyse die vollständige Umsetzung und die Bildung einer neuen Verbindung feststellen, welche die korrekte Masse aufwies. Die anschließende Alkylierung mit Verbindung **69** misslang jedoch. Zwar konnte die Bildung einer neuen Verbindung beobachtet werden, diese erwies sich in der Analytik aber als ein Gemisch verschiedener Verbindungen, die nicht im Zusammenhang mit der korrekten Verbindung standen. In Nachhinein könnte auch hier die Acetylgruppe problematisch sein und eine Alkylierung verhindern. Gleichzeitig verhindert bzw. erschwert das Freisetzen des Radikals dessen massenspektroskopischen Nachweis.

Da nun auch die zweite zuverlässige Methode zum Aufbau stereogener Zentren nicht funktionierte, wurde die Strategie geändert. Statt das Stereozentrum aufzubauen, soll nun ein Baustein verwendet werden, der die Stereoinformation bereits in Form einer funktionalisierten Methylgruppe trägt, welche die Verknüpfung mit dem Tetraisoindolin ermöglicht. Dies erfordert wiederum einen neuen Tetramethylisoindolinbaustein, da die Methylgruppe am Aromaten nun nicht mehr benötigt wird. Ausgehend von dieser Überlegung wurde sich für die Kupplung zwischen β -Iodalanin und einem am Aromaten bromierten Tetramethylisoindolin entschieden.

Syntheseplanung. Die ersten beiden Reaktionsschritte erfolgen analog zur Synthese des ersten Tetramethylisindolinlabels. Zunächst die Bildung des Phthalimids **97** aus dem Phthalsäureanhydrid (**96**) über eine Kondensation mit Benzylamin. Danach sorgt die Umsetzung von **97** in einer Grignard-Reaktion mit Methyljodid zur Bildung des Tetramethylisindolingrundgerüsts **98**. Nach Abspaltung der Schutzgruppe und Bromierung des Aromaten unter Bildung von Verbindung **99**, soll über eine Negishi-Kupplung das Aminosäurerückgrat **100** mit dem Arylhalogenid **99** verbunden werden. An die Oxidation von Verbindung **101** zum Nitoxidradikal **102** und der Verseifung des Methylresters zur Carbonsäure **103** schließt sich die Schützung des Nitroxids mit einer photolabilen Schutzgruppe, die unter den Bedingungen einer Peptidfestphasensynthese stabil ist, zu Verbindung **104** an. Der Austausch der Boc- gegen eine Fmoc-Schutzgruppe führt schlussendlich zur Endverbindung **76**. Die vollständige Synthese ist in Abbildung 114 gezeigt.

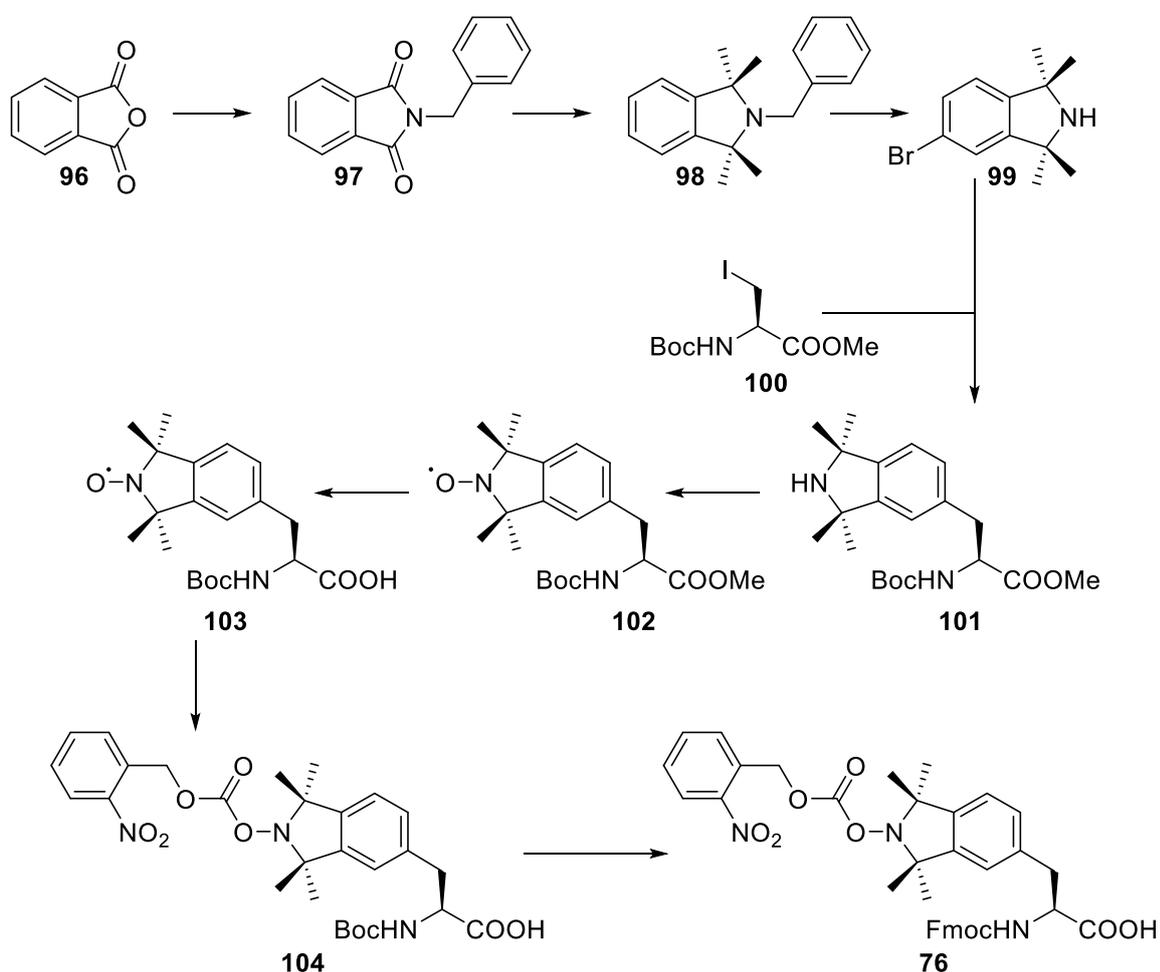


Abbildung 114: Syntheseroute zur Darstellung eines Phenylalaninderivats mit Tetramethylisindolinspinlabel über eine Negishi-Kupplung.

Darstellung des Phenylalaninderivats. Wie auch beim 4-Methyl-Derivat **63** wurde das Phthalsäureanhydrid (**96**) in einer Kondensation mit Benzylamin beinahe quantitativ in das entsprechende Phthalimid **97** umgesetzt. Gefolgt von der Grignard-Reaktion, welche die

stabilisierenden Methylsubstituenten eingeführt und ebenfalls in akzeptablen Ausbeuten gelang (siehe Abbildung 115). Mögliche Gründe für die nicht allzu hohe Ausbeute wurden bereits in einem vorherigen Abschnitt erläutert.

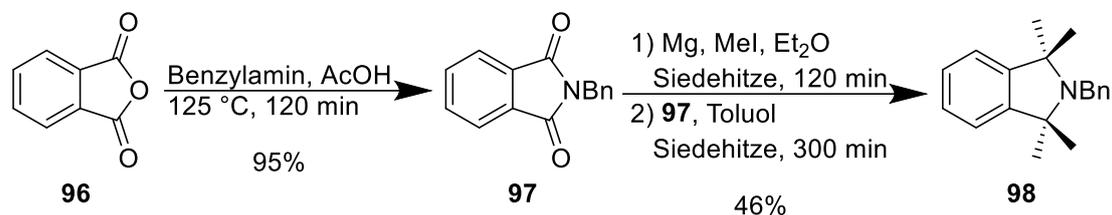


Abbildung 115: Synthese von Verbindung **98** ausgehend von Phthalsäureanhydrid (**96**).

Durch Abspalten der Benzylgruppe und Monobromierung des Aromaten, sollte Verbindung **99** erhalten werden. In ersten Versuchen wurde die Benzylgruppe hydrogenolytisch gespalten und das freie Amin versucht zu bromieren. Die Spaltung der Schutzgruppe verlief erwartungsgemäß in ausgezeichneten Ausbeuten, wohingegen die Bromierung unter verschiedensten Reaktionsbedingungen nicht gelingen wollte (siehe Abbildung 116). Erst die Verwendung großer Überschüsse Aluminiumtrichlorid erlaubte die Umsetzung zur bromierten Spezies und machte zusätzlich die vorausgehende Abspaltung der Benzylgruppe überflüssig, da im Verlaufe der Reaktion die benzyliche Position bromiert wird und dies während der Aufarbeitung zur Hydrolyse führt. Dies macht auch die Verwendung von mindestens zwei Äquivalenten elementaren Broms erforderlich, da die Bromierung des Aromaten erst im Anschluss geschieht.^{289,290}

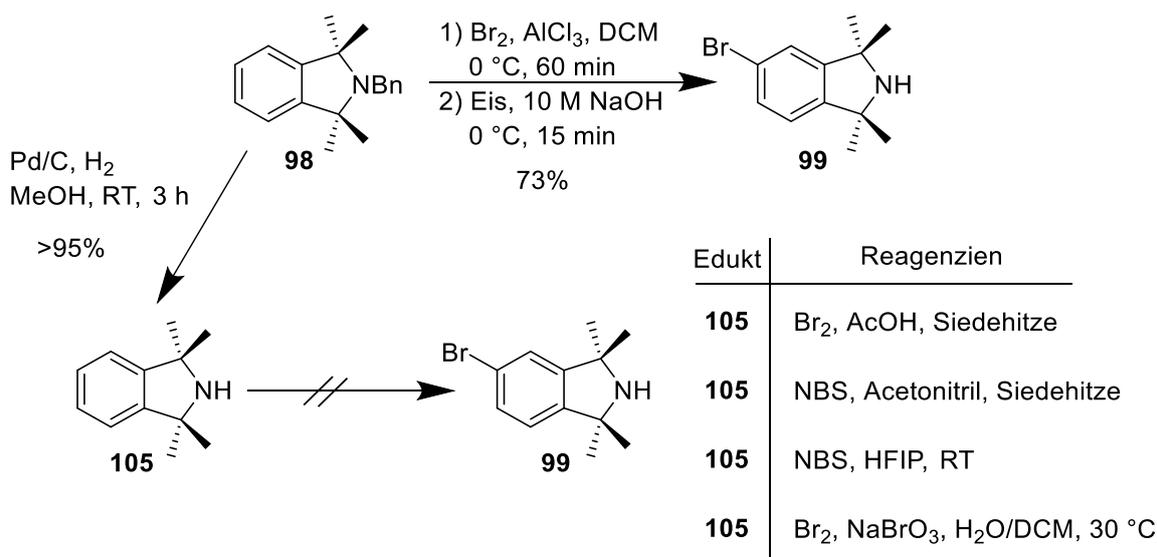


Abbildung 116: Verschiedene Bromierungen zur Darstellung von Verbindung **99**.

Im nächsten Schritt soll die Verknüpfung zwischen dem Iodalanin **100** und dem bromierten Tetramethylisindolin **99** erfolgen (siehe Abbildung 117). Weil sie viele funktionelle Gruppen toleriert

und das Reagenz eine geringe Basizität aufweist, wurde die Negishi-Kupplung als Verknüpfungsmethode gewählt. Das Iodalanin ist basen-induziert leicht in die entsprechende α,β -ungesättigte Verbindung zu überführen, was Lithiumorganyle und Grignard-Verbindungen als Kupplungsreagenzien ausschließt. Zinn-basierte Reaktionen wurden aufgrund der hohen Giftigkeit der Stannane zunächst nicht in Erwägung gezogen. Da es sich hierbei um eine Kreuzkupplung auf Basis von Palladium oder Nickel handelt, tragen die verwendeten Liganden maßgeblich zum Erfolg der Reaktion bei. Tri-(*o*-tolyl)phosphin, SPhos und Triphenylphosphin wurden als Liganden getestet, wobei die besten Ergebnisse mit SPhos erzielt wurden, aber immer in Kombination mit $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ andere Palladiumkatalysatoren wie $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ oder $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ lieferten wenig zufrieden stellende Ergebnisse, obwohl auch hier die Reaktion stets funktionierte. Die anderen Liganden haben zwar auch funktioniert, lieferten aber eine um durchschnittlich 15% geringere Ausbeute. Außerdem konnte durch Verwendung von Mikrowellenstrahlung die Reaktionszeit deutlich von drei Stunden auf 30 min reduziert werden. Über Messungen am Polarimeter konnte zudem ausgeschlossen werden, dass es im Reaktionsverlauf zur Racemisierung des Stereozentrums kam.

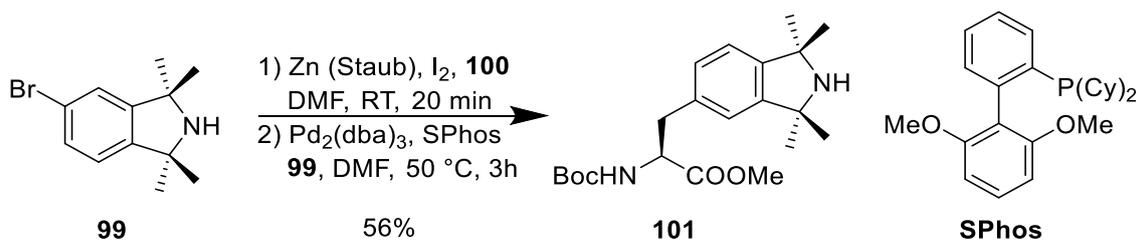


Abbildung 117: Verknüpfung der beiden Bausteine **100** und **99** über eine Negishi-Kupplung mit SPhos als Ligand unter Bildung des Phenylalaninderivats **96**.

Die anschließende Oxidation mit *m*CPBA zum Nitroxid **102** und Verseifung des Methyl ester zur Carbonsäure **103** lieferten erwartungsgemäß hervorragende Ausbeuten (siehe Abbildung 118). Da die Schützung des Radikals zur Bildung eines Kohlensäureesters führt, befürchtete man, dass die Verseifung mit LiOH zumindest zur teilweisen Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe führen könnte, weswegen die Verseifung des Esters vor der Schützung des Esters erfolgte, obwohl von der Handhabung ein umgekehrtes Vorgehen wahrscheinlich einfacher wäre. Die Anwesenheit eines zusätzlichen Nucleophils in Form des Carboxylats sollte an diesem Punkt unerheblich sein, da das Hydroxylamin aufgrund des α -Effekts deutlich nucleophiler sein sollte und bevorzugt mit dem Elektrophil, als welches die Schutzgruppe eingesetzt würde, reagiert.

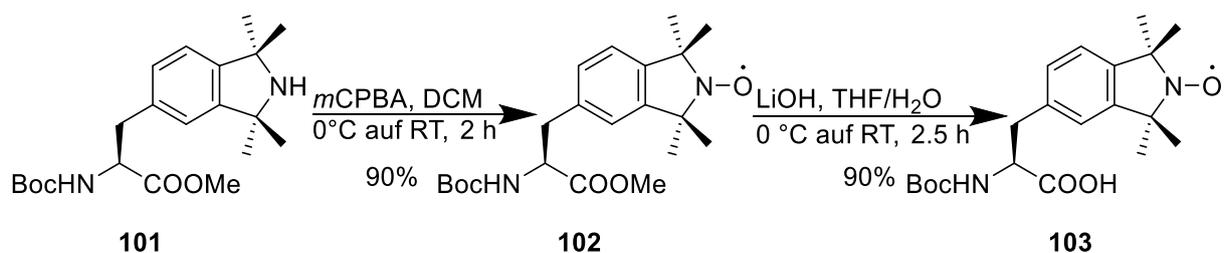


Abbildung 118: Synthese von Verbindung **103** ausgehend von **101** über Oxidation zu Verbindung **102** mit anschließender Verseifung des Methylesters.

Sollte es entgegen der Erwartung dennoch zu Problemen kommen, müsste man überprüfen, ob die Schutzgruppe die Verseifung überstünde oder falls nicht die freie Säure in den *tert*-Butylester überführen, welcher gleichzeitig mit der Boc-Gruppe Säure-induziert abgespalten würde.

Durch Reduktion des Nitroxidradikals **103** in das entsprechende Hydroxylamin **106** sollte es nun möglich sein, durch eine nukleophile Substitution an einem Nitrobenzylalkoholderivat **107** die geschützte Variante **104** zu erhalten (siehe Abbildung 119). Bis jetzt hat die Schützung jedoch noch nicht funktioniert. Möglicherweise ist das bis jetzt verwendete *N*-Acetylimidazolderivat des Nitrobenzylalkohols sterisch zu anspruchsvoll, um effektiv von dem ohnehin schon abgeschirmten Hydroxylamin angegriffen werden zu können. Eine Alternative wäre in Analogie zu Juliusson *et al.* die Umsetzung mit dem entsprechenden Chlorkohlensäureester dort wurde das Radikal mit einer Benzoylschutzgruppe versehen.²³⁶ Durch den +M-Effekt des zusätzlichen Sauerstoffatoms im Vergleich zu Benzoylchlorid könnte eine Lewisäure erforderlich sein, um die Elektrophilie am Carbonylkohlenstoff ausreichend zu erhöhen.

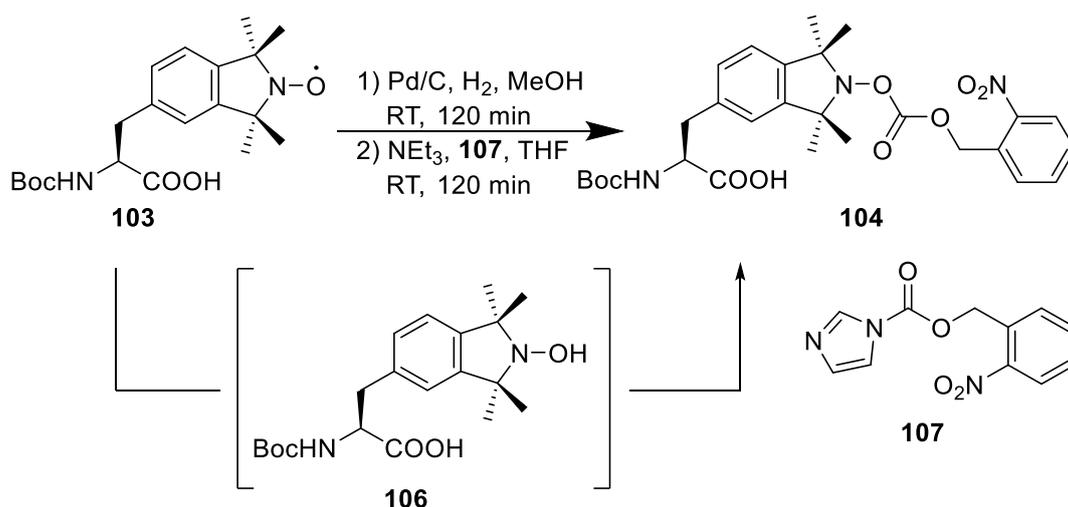


Abbildung 119: Geplante Synthese zur Darstellung eines photolabil geschützten Phenylalaninderivats **104**.

Zusammenfassung und Ausblick. Im Rahmen dieses Projektes sollte eine artifizielle enantiomerenreine Aminosäure auf Basis von Tetramethylisindolin geschaffen werden, die sich über die Peptidfestphasensynthese einbauen lassen sollte (siehe Verbindung **104**). Zu diesem Zweck sollte das betreffende Stereozentrum über eine Phasentransferkatalyse mit einem Maruoka-Katalysator neu aufgebaut werden. Die beiden benötigten Bausteine **69** und **72** konnten in einfachen Synthesen in guten Ausbeuten isoliert werden. Allein beim Einführen der vier Methylgruppen, welche zur Stabilisierung des Radikals dienen, sind die Ausbeuten weniger gut ausgefallen, was jedoch in diesem Fall normal ist, da formal ein O^{2-} -Ion eliminiert werden muss. Die Verknüpfung der beiden Bausteine gelang nicht. Dies war überraschend, weil in Vorversuche mit Benzylbromid die Bildung des Alkylierungsproduktes mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Begründung für das Misslingen der Kupplung könnte wie bereits erwähnt die Größe der einzufügenden Verbindung sein, da auch die zweite Methode zur stereoselektiven Alkylierung, die Myers-Alkylierung mittels Pseudoephedrin, nur für Benzylbromid Ergebnisse liefern konnte. Eine mögliche Zersetzung der eingesetzten Edukte wurde mehrfach durch NMR und Massenspektrometrie widerlegt und kann daher nicht ursächlich für die Probleme sein. Vorläufer **66** zu bromieren und das Amin erst nach der Kupplung zu oxidieren könnte sich als gangbare Alternative erweisen, wobei ein Erfolg fraglich wäre, falls die Größe wirklich ausschlaggebend wäre. Schließlich ließ sich doch über einen Konzeptwechsel die gewünschte Verknüpfung erzielen. Das bereits chirale Iodalanin **100** konnte hierbei mit einem neuen Tetramethylisindolinbaustein **99**, dessen Synthese ähnlich zu seinem Vorläufer erfolgte, in einer Negishi-Kreuzkupplung umgesetzt werden. Baustein **99** stellt hierbei eine reduzierte Variante derer dar, die in den beiden stereoselektiven Alkylierungen eingesetzt worden sind. Da sich Baustein **69** aus ungeklärten Gründen nicht umsetzen ließ, wurde zunächst auf eine möglichst frühe Verknüpfung der beiden Bausteine gesetzt, um ähnlichen Problemen vorzugreifen. Da die Folgeschritte problemlos verliefen, bleibt auf diesem Weg nur noch die Schützung des Radikals mit der photolabilen Schutzgruppe zu vollenden. Zudem wäre es interessant zu erfahren, ob die Probleme der Verknüpfbarkeit erneut auftreten, sobald Baustein **99** weiter funktionalisiert wird, sprich die beiden Bausteine in einem fortgeschrittenerem Stadium der Synthese miteinander verknüpft werden sollen. Sollten sich beide Varianten nicht realisieren lassen, so gibt es noch viele weitere Möglichkeiten der Darstellung von Aminosäurederivaten, wovon an dieser Stelle zwei interessante Alternativen angerissen werden. Zunächst wäre eine weitere Kreuzkupplung zu nennen. Diese geht von Serin aus und überführt dieses in die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung.

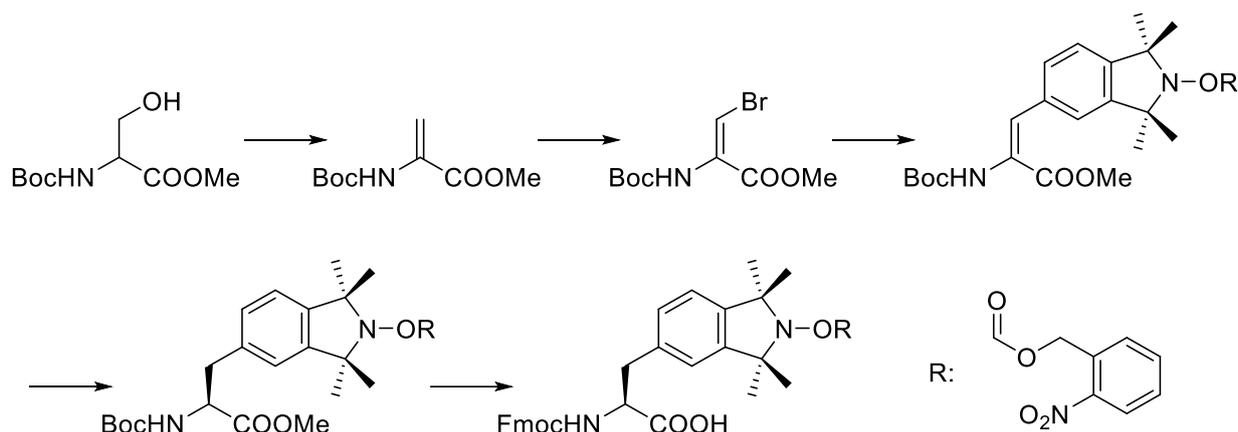


Abbildung 120: Mögliche Syntheseroute zur Darstellung eines Phenylalaninderivats über stereoselektive Hydrierung.

Durch anschließende Bromierung zum Vinylbromid sollte eine effektive Kreuzkupplung auch mit aggressiveren Methoden realisierbar sein. Möglicherweise kann auf diese Art und Weise direkt ein geschütztes Tetramethylisoindolin eingefügt werden. Das Einfügen der Stereoinformation würde dann über eine selektive Hydrierung beispielsweise mit einem Wilkinson-Katalysator und einem chiralen Liganden erfolgen (siehe Abbildung 120).^{291–293} Die zweite Alternative ist die von Dieter Seebach ausgearbeitete und durch Dellaria und Williams erweiterte Methode der selbstregenerierenden Stereozentren, angewendet auf das achirale Glycin. Der Vorteil hierbei ist, dass neben dem eigentlichen chiralen und zyklischen Glycinderivat keine weiteren chiralen Hilfsstoffe eingesetzt werden müssen, ähnlich der Myers Alkylierung. Das Herzstück der Reaktion bildet dabei ein Oxazolidinderivat, welches erst deprotoniert und dann alkyliert wird. Durch das Abschirmen einer der Halbräume durch Substituenten erfolgt hierbei die Kontrolle des stereogenen Zentrums (siehe Abbildung 121).^{294,295}

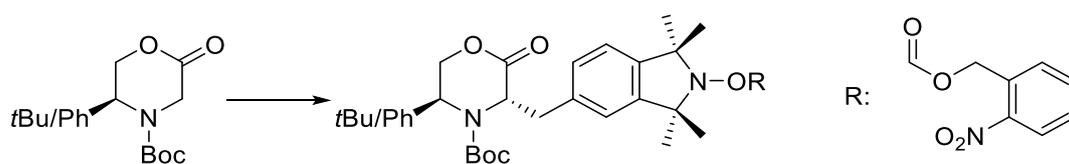


Abbildung 121: Induktion von Chiralität mit einer chiralen Hilfsgruppe nach Dellaria *et al.*²⁹⁵ zur Synthese von Aminosäuren.

Mit dem geschützten Phenylalaninderivat können anschließend über die Peptidfestphasensynthese beliebige Proteine untersucht werden. Das technische Limit der Synthese muss hierbei jedoch berücksichtigt werden. Kurze Peptide (bis 100 Aminosäuren) sind direkt zugänglich, längere hingegen müssen aus Einzelfragmenten durch Ligation zusammengesetzt werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Allgemeine Anmerkungen

Allgemeine Arbeitsbedingungen. Alle kritischen Schritte wurden unter Inertgas (Argon 5.0) durchgeführt. Die Glasgeräte wurden mit einem Heißluftföhn im Ölpumpenvakuum getrocknet und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit Argon befüllt. Die Lösungsmittel für die Synthesen wurden in *p.a.*-Qualität bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Lösungsmittel für Reaktionen unter wasser- und sauerstofffreien Bedingungen besaßen ebenfalls *p.a.*-Qualität und wurden unter Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit über Molekularsieb gelagert. Käuflich erworbene Edukte wurden ebenfalls ohne Reinigung eingesetzt. Tetrahydrofuran für die Herstellung von Lithiumdiisopropylamid wurde über Natrium/Benzophenon getrocknet und frisch destilliert. Diisopropylamin wurde über Calciumhydrid getrocknet und frisch von diesem destilliert. Lithiumchlorid wurde vor dem Gebrauch im Vakuum bei 300 °C ausgeheizt. Die Lösungsmittel (Ethylacetat, Cyclohexan, Aceton, Methanol, Dichlormethan) für die Säulenchromatographie wurden in hoher technischer Qualität bezogen. Das Kieselgel (60 Å Porengröße, 40 – 63 µm Partikelgröße) und die Platten für Dünnschichtchromatographie (ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄) wurden von Macherey-Nagel bezogen.

NMR-Spektroskopie. Die Charakterisierung mittels NMR wurde in deuterierten Lösungsmitteln (DMSO-*d*₆, CDCl₃, CD₃CN, DCM-*d*₂, MeOD-*d*₃, AcOD-*d*₃, Aceton-*d*₆) bei 300 K durchgeführt. Für die verwendeten Spektrometer und Messfrequenzen der einzelnen Kerne siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten NMR-Spektrometer und Messfrequenzen.

	$\delta(^1\text{H})$ [MHz]	$\delta(^{13}\text{C})$ [MHz]	$\delta(^{29}\text{Si})$ [MHz]	$\delta(^{31}\text{P})$ [MHz]
DPX-250	250	–	–	–
Avance-300	300	75	–	–
Avance-400	400	100	80	162
Avance-500	500	126	–	–
Avance-600	600	151	–	–

Die chemischen Verschiebungen werden als δ -Wert in parts per million (ppm) angegeben. Die skalaren Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz [Hz] mit den Feinstrukturen s für Singulett, d für Dublett, t für Triplett, q für Quartett, quin für Quintett, sep für Septett, m für Multipllett, dd für Dublett von Dubletts, bs für breites Singulett, td für Triplett von Dubletts und ddd Dublett von Dubletts von Dubletts angegeben. Die beobachteten Resonanzen werden gegen den Restprotonengehalt der verwendeten Lösungsmittel (sekundärer Standard: für die chemische Verschiebung sowie deren Multiplizität siehe

Tabelle 8 und 9) bezogen auf die Resonanz von Tetramethylsilan (primärer Standard: $\delta = 0.00$) kalibriert.

Tabelle 8: Übersicht der δ -Werte und deren Multiplizitäten der verwendeten deuterierten Lösungsmittel im ^1H -Spektrum.^{296,297}

	DCM-d ₂	MeOD-d ₃	DMSO-d ₆	Aceton-d ₆	AcOD-d ₃	CDCl ₃	CD ₃ CN
Multiplizität	t	s	quin	quin	quin	s	quin
δ (^1H) [ppm]	5.32	3.31	2.50	2.05	2.04	7.26	1.94

Tabelle 9: Übersicht der δ -Werte und deren Multiplizitäten der verwendeten deuterierten Lösungsmittel im ^{13}C -Spektrum.^{296,297}

	DCM-d ₂	MeOD-d ₃	DMSO-d ₆	Aceton-d ₆	AcOD-d ₃	CDCl ₃	CD ₃ CN
Multiplizität	quin	sep	sep	sep	sep	t	sep
δ (^{13}C) [ppm]	54.00	49.00	39.52	29.84	20.00	77.16	1.32

Die aufgenommenen ^{13}C -Spektren sind Protonen-entkoppelt. Die Zuordnung der einzelnen Signale im ^1H -Spektrum beruhen auf ^1H - ^1H -COSY-Daten.

Massenspektrometrie. ESI-MS-Spektren wurden an einem Thermo Fisher Scientific Surveyor MSQ aufgenommen und die HRMS-Spektren an Thermo-Scientific MALDI-LTQ-Orbitrap XL.

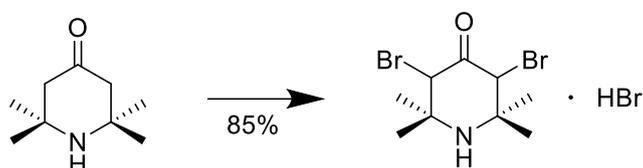
Schmelzpunkt. Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler Heißtischmikroskop bestimmt. Der Schmelzpunkt ergibt sich hierbei als Mittelwert aus zwei Einzelmessungen.

CHN-Verbrennungsanalyse. Zur Bestimmung der CHN-Anteile wurden Reinproben mittels eines vario MICRO cubes analysiert. Daraus erhaltene und angegebene Messwerte entsprechen einer einzelnen Messung.

Polarimeter. Zur Bestimmung der Drehwerte wurde das Model 241 MC von Perkin Elmer verwendet.

4.2 Synthesen

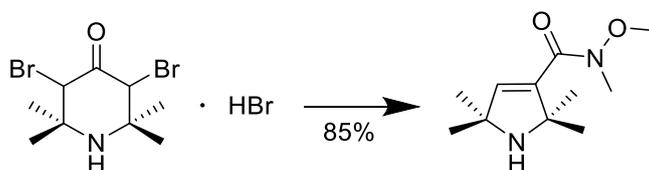
Hydrobromid von *meso*-3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on (5)



Die Versuchsvorschrift orientiert sich an einer von Wu *et al.* publizierten Methode.²⁴⁹

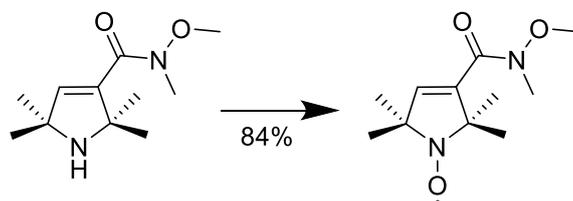
Zu einer Lösung aus 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-on (**4**) (15.00 g, 96.63 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL Eisessig wurde langsam eine Lösung aus Brom (9.90 mL, 193.25 mmol, 2.0 eq.) in 75 mL Eisessig zugetropft. Hierbei fällt zunächst ein Feststoff aus, welcher sich durch weitere Zugabe auflöst, um anschließend erneut auszufallen. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wurde filtriert und nacheinander mit 100 mL Eisessig, 50 mL Wasser und 50 mL Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen an Luft wurde das Produkt als weißes Hydrobromidsalz (85%, 32.45 g, 82.37 mmol) erhalten, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet wurde. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 5.48 (s, 2H, H-3/H-5), 1.70 (s, 6H, Methyl), 1.35 (s, 6H, Methyl) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 188.85, 64.31, 60.22, 27.84, 22.11, 18.16 ppm. MS (ESI): m/z: 312.06, 314.06, 316.06 [M+H⁺]. HRMS: errechnet für C₉H₁₆Br₂NO 311.95986, 313.95782, 315.95577 [M+H⁺]; gefunden 311.95954, 313.95751, 315.95524.

2,5-Dihydro-N-methoxy-N,2,2,5,5-pentamethyl-1H-pyrrol-3-carboxamid (6)



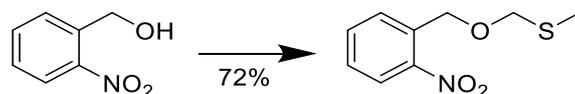
Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (8.91 g, 91.38 mmol, 1.25 eq.) in 50 mL Wasser wurden 50 mL Triethylamin zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde das Hydrobromidsalz **5** (28.80 g, 73.11 mmol, 1.0 eq.) in kleinen Portionen und unter starkem Rühren zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat wurden die Phasen separiert und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde fraktioniert destilliert (88 °C und <1 mbar) und als gelbe Flüssigkeit, welche schnell nachdunkelt, erhalten (85%, 13.22 g, 62.15 mmol). Alternativ zur Destillation kann auch eine Reinigung mittels Säulenchromatographie durchgeführt werden (Dichlormethan/Methanol 95:5). $R_f = 0.45$ (Dichlormethan/Methanol 95:5). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 6.05 (s, 1H, H-4), 4.33 (bs, 1H, -NH), 3.55 (s, 3H, -OCH₃), 3.16 (s, 3H, -NCH₃), 1.42 (s, 6H, Methyl), 1.31 (s, 6H, Methyl) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 165.72, 140.13, 138.40, 77.16, 69.34, 65.20, 61.01, 33.22, 29.70, 29.45 ppm. MS (ESI): m/z : 213.28 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 213.15975; gefunden 213.15974.

2,5-Dihydro-3-[(*N*-methoxy-*N*-methylamino)carbonyl]-2,2,5,5-tetramethyl-1*H*-pyrrol-1-yloxy (7)



Verbindung **6** (13.22 g, 62.27 mmol, 1.0 eq.) wurde in 110 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde portionsweise *meta*-Chlorperbenzoesäure (27.91 g, 124.55 mmol, 2.0 eq., 77% Reinheit) zugegeben. Nach vollendeter Zugabe der Persäure wurde das Reaktionsgemisch weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde nun mit 200 mL einer wässrigen 20%igen Kaliumhydroxidlösung gewaschen, wobei der Feststoff in Lösung geht. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Verbindung **7** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1) und Umkristallisation aus Cyclohexan als gelbe Nadeln (84%, 11.95 g, 52.58 mmol) erhalten $R_f = 0.77$ (Dichlormethan/Methanol 95:5). Smp.: 57 °C (Lit: 56.0 – 56.5 °C²⁹⁸). Für die NMR-Experimente wurde Phenylhydrazin zugegeben, um das Radikal zum Amin zu reduzieren. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 6.02 (s, 1H, H-4), 3.54 (s, 3H, -OCH₃), 3.15 (s, 3H, -NCH₃), 1.35 (s, 6H, Methyl), 1.25 (s, 6H, Methyl) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 165.54, 138.15, 136.84, 129.31, 69.37, 61.22, 33.42, 24.96, 24.76 ppm. EA: errechnet für C₁₁H₁₉N₂O₃ C: 58.13, H: 8.43, N: 12.33; gefunden C: 58.31, H: 8.59, N: 12.17.

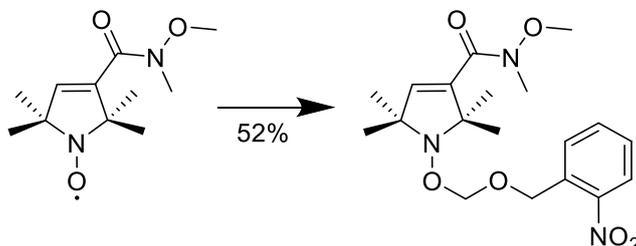
1-[[[Methylthio]methoxy)methyl]-2-nitrobenzen (18)



Die Versuchsvorschrift orientiert sich an einer von Yong *et al.* publizierten Methode.²⁵⁰

o-Nitrobenzylalkohol **17** (5.00 g, 32.65 mmol, 1.0 eq.) wurde in 75 mL Eisessig gelöst. Dimethylsulfoxid (47.0 mL, 650 mmol, 20.0 eq.) wurde hinzugefügt gefolgt von der langsamen Zugabe von Essigsäureanhydrid (61.7 mL, 650 mmol, 20.0 eq.), beides bei Raumtemperatur. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 72 h bei Raumtemperatur gerührt, um danach vorsichtig zu 300 mL einer auf 0 °C gekühlten 10 M wässrigen Kaliumhydroxidlösung getropft zu werden. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Bei der Reaktion entstehende Nebenprodukte werden erst destillativ entfernt (>1 mbar und 100 °C Ölbadtemperatur). Der Destillationsrückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1). Die Zielverbindung **18** wurde als gelbes Öl (72%, 5.00 g, 23.45 mmol) erhalten. $R_f = 0.51$ (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.08 – 8.05 (m, 1H, H-3), 7.77 – 7.76 (m, 1H, H-6), 7.66 – 7.62 (m, 1H, H-5), 7.47 – 7.43 (m, 1H, H-4), 4.99 (s, 2H, Nitrophenyl-CH₂-O-), 4.78 (s, 2H, -O-CH₂-S-), 2.20 (s, 3H, Methyl) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 134.48, 133.71, 129.09, 128.28, 124.87, 75.66, 66.78, 14.38 ppm. MS (ESI): m/z: 213.27 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₉H₁₁NO₃S [M + Na⁺]: 236.03519; gefunden 236.03403

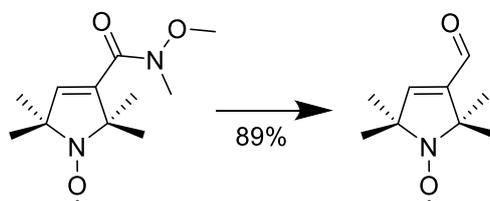
N-Methoxy-*N*,2,2,5,5-pentamethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy)methoxy]-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-3-carboxamid (**8**)



Die Versuchsvorschrift orientiert sich an einer von Weinrich *et al.* publizierten Methode.²⁹⁹

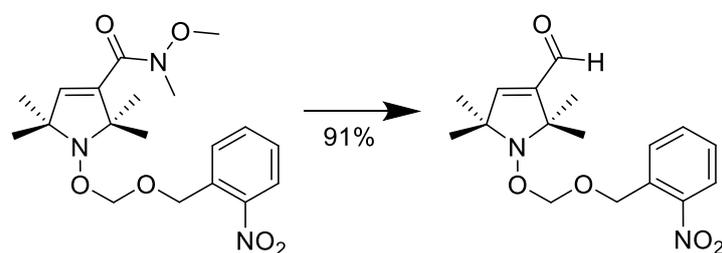
Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus *o*-Nitrobenzylmethylthiomethylether (**18**) (1.00 g, 4.68 mmol, 1.5 eq.) in 15 mL trockenem Dichlormethan wurde Sulfurylchlorid zugetropft (0.44 mL, 5.39 mmol, 1.7 eq.). Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 10 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit je 20 mL gesättigter Natriumhydrogen- carbonatlösung und einmal mit 20 mL Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur) und der Rückstand im Hochvakuum getrocknet. Das gelbe Öl wurde nun in 10 mL trockenem Benzol aufgenommen und zu einem vorgeheizten Reaktionsgemisch, bestehend aus Verbindung **7** (710 mg, 3.12 mmol, 1.0 eq.), Kupferpulver (300 mg, 4.68 mmol, 1.5 eq.), Kupfer(II)trifluormethansulfonat (60 mg, 0.16 mmol, 0.05 eq.) und 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridyl (85 mg, 0.47 mmol, 0.15 eq.) in 20 mL trockenem Benzol, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und für 21 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgel filtriert und mit Dichlormethan/Methanol 3:1 eluiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1). Die Zielverbindung wurde als hellgelbes Öl (52%, 638 mg, 2.43 mmol) erhalten, welches sich mit der Zeit verfestigte. $R_f = 0.35$ (Cyclohexan/Ethylacetat 5:1). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.11 (d, ³J = 8.2 Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.87 (d, ³J = 7.8 Hz, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.65 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.44 (t, ³J = 8.1 Hz, 1H, Nitrophenyl H-4), 6.01 (s, 1H, Pyrrol H-4), 5.14 (s, 2H, Nitrophenyl-CH₂-O-), 5.06 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.63 (s, 3H, -O-CH₃), 3.24 (s, 3H, -N-CH₃), 1.46 – 1.31 (m, 12H, Pyrrol-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 165.90, 147.24, 138.14, 134.98, 133.91, 128.77, 128.12, 124.94, 100.56, 67.66, 61.22, 33.58, 23.55, 22.82 ppm. MS (ESI): m/z: 394.37 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₁₉H₂₈N₃O₆ [M + H⁺]: 394.19726; gefunden 394.19722.

3-Formyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-1-yloxy (20)



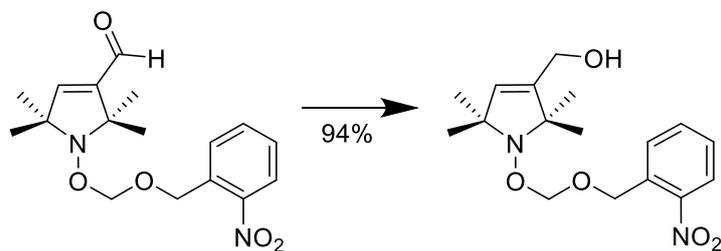
Zu einer auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung aus Verbindung **7** (2.00 g, 8.80 mmol, 1.0 eq.) in 26 mL trockenem Diethylether wurde Diisobutylaluminumhydrid in Toluol (14.70 mL, 17.60 mmol, 1.2 M, 2.0 eq.) zugetropft. Nach 45 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktionslösung langsam auf 100 mL eisgekühlte, verdünnte Salzsäure gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt konnte nach einer säulenchromatographischen Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) und Umkristallisation aus *n*-Hexan als gelbe Nadeln (89%, 1.31 g, 7.79 mmol) erhalten werden. $R_f = 0.45$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). Smp.: $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lit.: $78 - 79\text{ }^{\circ}\text{C}^{300}$). EA: errechnet für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}_2$ C: 64.26, H: 8.39, N: 8.33; gefunden C: 64.36, H: 8.32, N: 8.08.

2,2,5,5-Tetramethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy)methoxy]-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carbaldehyd (9)



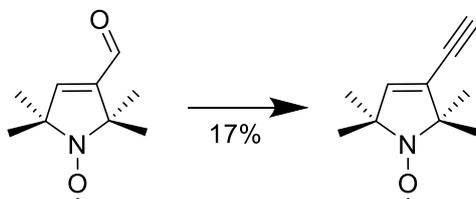
Zu einer auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung aus Verbindung **8** (2.06 g, 5.23 mmol, 1.0 eq.) in 40 mL trockenem Diethylether wurde Diisobutylaluminiumhydrid in Toluol (8.70 mL, 10.47 mmol, 1.2 M, 2.0 eq.) zugetropft. Nach 45 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktionslösung langsam auf 100 mL eisgekühlte, verdünnte Salzsäure gegossen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 8:1) wurde die Zielverbindung als ein farbloses Öl (91%, 1.60 g, 4.79 mmol) erhalten, welches sich mit der Zeit verfestigte. $R_f = 0.80$ (Cyclohexan/Ethylacetat 8:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 9.61 (s, 1H, $-\text{CHO}$), 8.11 (dd, $^4J = 1.2\text{ Hz}$, $^3J = 8.2\text{ Hz}$, Nitrophenyl H-3), 7.87 – 7.85 (m, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.66 (td, $^4J = 1.2\text{ Hz}$, $^3J = 7.8\text{ Hz}$, Nitrophenyl H-5), 7.47 – 7.43 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 6.51 (s, 1H, Pyrrol H-4), 5.12 (s, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$), 5.03 (s, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-O-}$), 1.43 – 1.33 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 188.88, 154.06, 147.20, 145.69, 134.93, 133.94, 128.71, 128.14, 124.95, 100.81, 69.48, 68.83, 67.64, 28.70, 27.94, 22.72, 22.35 ppm. MS (ESI): m/z: 335.23 $[\text{M} + \text{H}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}^+]$: 335.16015; gefunden 335.16024.

[2,2,5,5-Tetramethyl-1-([(2-nitrobenzyl)oxy]methoxy)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl]methanol (44)



Zu einer Lösung des Aldehyds **9** (1.73 g, 5.17 mmol, 1.0 eq.) in 15 mL Wasser/Tetrahydrofuran im Verhältnis 1:1 wurde Natriumborhydrid (235 mg, 6.21 mmol, 1.2 eq.) zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt bzw. so lange, bis mittels Dünnschicht-Chromatographie kein Edukt mehr nachgewiesen werden konnte. 10 mL einer gesättigten Ammoniumchloridlösung wurden zugeben und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Das Produkt konnte hierbei als leicht gelblicher Feststoff (94%, 1.63 g, 4.85 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.52$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.11 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.89 – 7.87 (m, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.66 (td, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.47 – 7.42 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 5.46 (t, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, Pyrrol H-4), 5.13 (s, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$), 5.03 (s, 2H, $\text{-O-CH}_2\text{-O-}$), 4.16 (bs, 2H, $\text{-CH}_2\text{-OH}$), 1.33 (t, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, -OH), 1.27 – 1.20 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 144.14, 135.20, 133.91, 129.01, 128.76, 128.04, 124.91, 100.61, 70.16, 67.94, 67.50, 59.66 ppm. MS (ESI): m/z : 337.03 $[\text{M} + \text{H}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}^+]$: 337.17580; gefunden 337.17597.

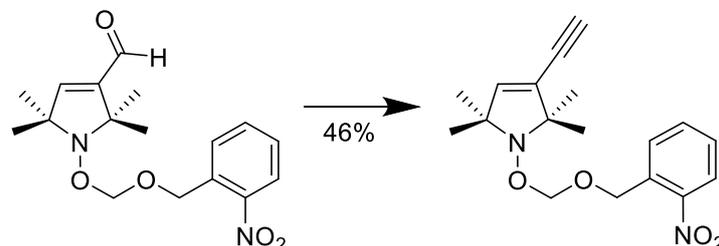
3-Ethynyl-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1H-pyrrol-1-yloxyl (22)



Die Synthese orientiert sich an Arbeiten von Corey und Fuchs³⁰¹ sowie Rao, Jadhav *et al.*³⁰².

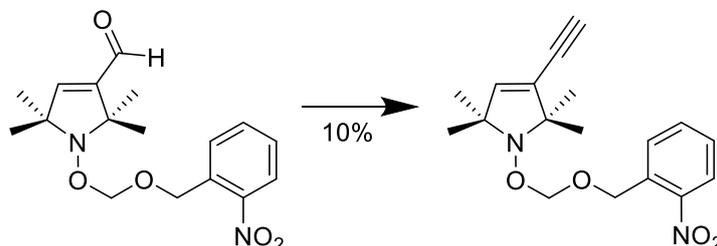
Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung der Verbindung **20** (3.83 g, 22.77 mmol, 1.0 eq.) in 150 mL trockenem Dichlormethan wurden Tetrabrommethan (15.10 g, 45.54 mmol, 2.0 eq.) und Triphenylphosphin (23.89 g, 91.08 mmol, 4.0 eq.) portionsweise zugegeben und für 60 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 200 mL Cyclohexan zugegeben und der Feststoff filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan → Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff (89%, 6.54 g, 20.18 mmol) erhalten und direkt weiter umgesetzt. Es sei anzumerken, dass eine wässrige Aufarbeitung zum Verlust des Produktes führt. Das Dibromolefin **23** (1.01 g, 3.12 mmol, 1.0 eq.) wurde in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf –78 °C gekühlt. Anschließend wurde tropfenweise *n*-Butyllithium (2.74 mL, 6.86 mmol, 2.20 eq., 2.50 M in Hexan) zugegeben und für 60 min bei –78 °C und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung, welche zuvor intensiv gelb gefärbt war, entfärbte sich bei Raumtemperatur deutlich. Durch Zugabe von 50 mL Wasser wurde die Reaktion beendet und die organische Phase mit weiteren 50 mL Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt konnte nach säulenchromatographischer Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) und Umkristallisation aus *n*-Hexan als gelber Feststoff isoliert werden (20%, 100 mg, 0.61 mmol). $R_f = 0.30$ (Cyclohexan/Diethylether 3:1). Smp.: 122 °C (Lit.: 122 – 123 °C³⁰³). EA: errechnet für C₁₀H₁₄NO C: 73.14, H: 8.59, N: 8.53; gefunden C: 72.94, H: 8.40, N: 8.78.

3-Ethynyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy)methoxy]-2,5-dihydro-1H-pyrrol über Seyferth-Gilbert-Homologisierung (2)



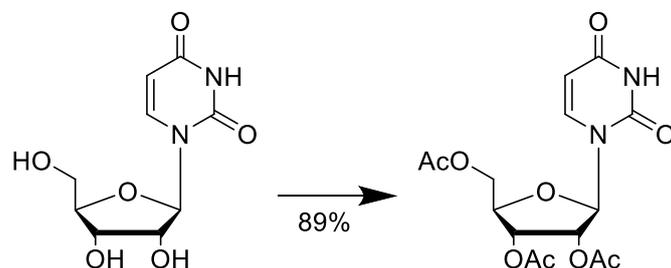
Aldehyd **9** (1.50 g, 4.49 mmol, 1.0 eq.) wurde in 60 mL trockenem Methanol gelöst. Kaliumcarbonat (3.10 g, 22.43 mmol, 5.0 eq.) und Bestmann–Ohira Reagenz (3.02 g, 15.70 mmol, 3.5 eq.) wurden nacheinander hinzugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Verdünnen der Reaktionsmischung mit 50 mL Diethylether wurde die organische Phase viermal mit je 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Zielverbindung wurde nach säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 15:1) des Rückstandes als farbloser Feststoff (46%, 0.68 g, 2.07 mmol) erhalten. $R_f = 0.62$ (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.11 (dd, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.87 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.66 (td, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.45 (t, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-4), 5.86 (s, 1H, Pyrrol H-4), 5.12 (s, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$), 5.02 (s, 2H, $\text{-O-CH}_2\text{-O-}$), 2.99 (s, 1H, Alkin-H), 1.34 – 1.23 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 147.19, 140.98, 135.08, 133.91, 128.72, 128.06, 126.92, 124.91, 100.56, 80.29, 78.32, 71.57, 69.02, 67.56, 29.26, 28.36, 23.27, 22.83 ppm. MS (ESI): m/z: 331.27 [M + H^+]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ [M + H^+]: 331.16578; gefunden 331.16532.

3-Ethynyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy)methoxy]-2,5-dihydro-1H-pyrrol über Colvin-Umlagerung (2)



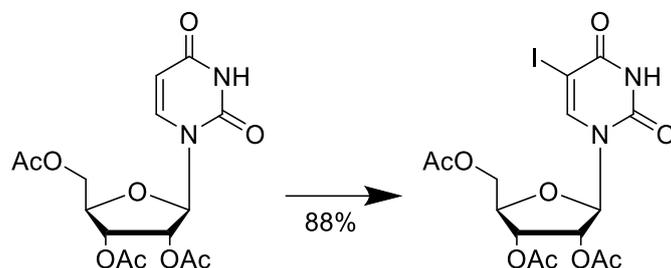
Diisopropylamin (38.2 μL , 271.9 μmol , 1.0 eq.) wurde in 4 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Nach der Zugabe von *n*-Butyllithium (108.8 μL , 271.9 μmol , 1.0 eq., 2.50 M in Hexan) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktionslösung für fünf Minuten gerührt und dann langsam Trimethylsilyldiazomethan (453.1 μL , 271.9 μmol , 1.0 eq.) zugetropft und mit 1 mL trockenem Tetrahydrofuran nachgespült und weitere 30 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend erfolgte die tropfenweise Zugabe des Aldehyds **9** (100.0 mg, 299.1 μmol , 1.1 eq.) gelöst in 1 mL trockenem Tetrahydrofuran (langsam zugetropft). Die Reaktionslösung wurde erst 60 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 mL Wasser beendet und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahieren und die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 20:1). Das Produkt konnte als farbloser Feststoff (10%, 9.40 mg, 28.5 μmol) isoliert werden. $R_f = 0.6$ (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8.11 (dd, $^3J = 8.1\text{ Hz}$, $^4J = 1.1\text{ Hz}$, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.86 (d, $^3J = 7.9\text{ Hz}$, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.67 (td, $^3J = 7.3\text{ Hz}$, $^4J = 1.1\text{ Hz}$, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.45 (t, $^3J = 8.1\text{ Hz}$, 1H, Nitrophenyl H-4), 5.85 (s, 1H, Pyrrol H-4), 5.11 (s, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$), 5.01 (s, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-O-}$), 2.98 (s, 1H, Alkin-H), 1.34 – 1.23 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 147.20, 140.97, 135.04, 133.93, 128.72, 128.06, 126.91, 124.91, 100.58, 80.30, 78.32, 71.58, 69.02, 67.59, 29.26, 28.37, 23.29, 22.85 ppm. MS (ESI): m/z : 331.27 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 331.16578; gefunden 331.16551.

2',3',5'-Tri-O-acetyluridin (11)



Zu einer Suspension aus Uridin (**10**) (4.88 g, 19.98 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL Acetonitril wurden Triethylamin (22.3 mL, 159.9 mmol, 8.0 eq.), Essigsäureanhydrid (15.1 mL, 159.9 mmol, 8.0 eq.) und eine katalytische Menge an 4-(Dimethylamino)pyridin zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt und anschließend mit Dichlormethan and Wasser verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase viermal mit je 100 mL Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat und dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 97:3) und anschließend aus Ethanol umkristallisiert. Die Zielverbindung konnte als farblose Kristalle (89%, 6.51 g, 17.58 mmol) erhalten werden. $R_f = 0.30$ (Dichlormethan/Methanol 97:3). Smp.: 133 °C (Lit: 130 – 132 °C³⁰⁴). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 9.41 (bs, 1H, –NH), 7.38 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, H–6), 6.04 – 6.03 (m, 1H, H–1'), 5.78 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, H–5), 5.35 – 5.30 (m, 2H, H–2', H–3'), 4.36 – 4.29 (m, 3H, H–4', H–5'/5''), 2.13 (s, 3H, –OAc), 2.12 (s, 3H, –OAc), 2.09 (s, 3H, –OAc) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 170.25, 169.76, 162.96, 150.40, 139.42, 103.56, 87.58, 80.06, 77.16, 72.83, 70.32, 63.28, 20.87, 20.61, 20.51 ppm. MS (ESI): m/z : 371.25 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 393.09045; gefunden 393.09031.

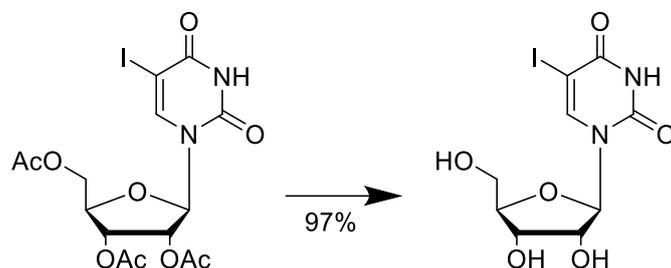
2',3',5'-Tri-O-acetyl-5-ioduridin (12)



Die Versuchsvorschrift orientiert sich an einer von Asakura und Robins publizierten Methode.²⁵⁷

Eine Lösung aus Verbindung **11** (5.73 g, 15.47 mmol, 1.0 eq.), Iod (2.36 g, 9.28 mmol, 0.6 eq.) und Ammoniumcer(IV)nitrat (4.24 g, 7.74 mmol, 0.5 eq.) in 250 mL trockenem Acetonitril wurde für 90 min bei 80 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in einem Zweiphasengemisch aus Ethylacetat (100 mL) gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) und gesättigter Natriumthiosulfatlösung (25 mL) aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Nachdem die vereinte organische Phase nochmal mit je 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen wurde, wurde sie anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Zielverbindung konnte nach Umkristallisation aus Ethanol als farblose Kristalle (88%, 6.76 g, 13.62 mmol) erhalten werden. Smp.: 175 °C (Lit: 177 – 178 °C³⁰⁵). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 9.46 (bs, 1H, -NH), 7.88 (s, 1H, H-6), 6.07 – 6.04 (m, 1H, H-1'), 5.34 – 5.30 (m, 2H, H-2', H-3'), 4.40 – 4.31 (m, 3H, H-4', H-5'/5''), 2.22 (s, 3H, -OAc), 2.11 (s, 3H, -OAc), 2.09 (s, 3H, -OAc) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 170.22, 169.75, 169.74, 159.74, 150.13, 143.85, 87.29, 80.39, 73.18, 70.27, 69.78, 63.13, 21.20, 20.60, 20.50 ppm. MS (ESI): m/z: 497.18 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₁₅H₁₇I N₂O₉Na [M + Na⁺]: 518.98709; gefunden 518.98624.

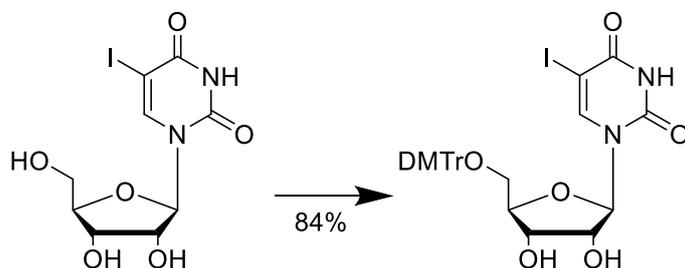
5-Ioduridin (13)



Die Versuchsvorschrift orientiert sich an einer von Meneghesso *et al.* publizierten Methode.³⁰⁶

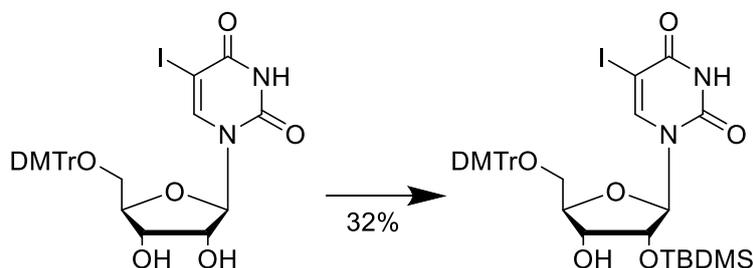
Zu einer Lösung aus Verbindung **12** (12.74 g, 25.67 mmol, 1.0 eq.) in 200 mL trockenem Methanol wurde eine Lösung aus Natriummethoxid (5.40 M, 14.3 mL, 77.0 mmol, 3.0 eq.) in Methanol zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 120 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Dowex® 50WX8 50 – 100(H) neutralisiert. Der Feststoff wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert und so die Zielverbindung als farbloser Feststoff (97%, 9.23 g, 24.94 mmol) erhalten. Smp.: 190 °C Zersetzung (Lit: 205 – 210 °C Zersetzung³⁰⁵). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 11.66 (bs, 1H, -NH), 8.47 (s, 1H, H-6), 5.72 (d, ³J = 4.7 Hz, 1H, H-1'), 5.39 (d, ³J = 5.2 Hz, 1H, 2'-OH), 5.24 (t, ³J = 4.6 Hz, 1H, 5'-OH), 5.05 (d, ³J = 4.9 Hz, 1H, 3'-OH), 4.05 – 4.04 (m, 1H, H-2'), 3.99 – 3.96 (m, 1H, H-3'), 3.87 – 3.85 (m, 1H, H-4'), 3.70 – 3.65 (m, 1H, H-5'/5''), 3.59 – 3.54 (m, 1H, H-5'/5'') ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 160.48, 150.36, 145.14, 88.31, 84.72, 73.93, 69.38, 69.27, 60.20 ppm. MS (ESI): m/z: 369.22 [M – H⁺]. HRMS: errechnet für C₉H₁₁IN₂O₆Na [M + Na⁺]: 392.95540; gefunden 392.95536.

5'-O-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-5-iodouridin (14)



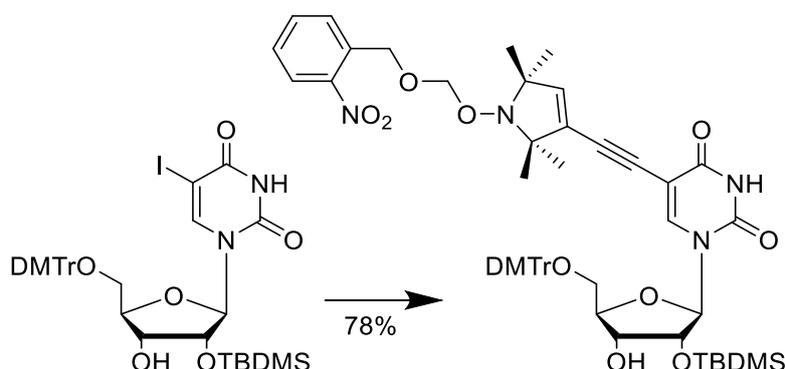
Zu einer Lösung aus 5-Iodouridin (**13**) (8.50 g, 22.97 mmol, 1.0 eq.) in 150 mL trockenem Pyridin wurden im Abstand von 30 min über einen Zeitraum von 150 min 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (10.12 g, 29.86 mmol, 1.3 eq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde dann noch weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur) und der Rückstand mehrfach mit Toluol evaporiert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung aufgenommen, die Phasen getrennt und die organische Phase mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Reinigung des Rückstandes mittel Säulenchromatographie (Aceton/Cyclohexan/Triethylamin 90:10:1) ergab das gewünschte Produkt als weißen Schaum (84%, 12.95 g, 19.26 mmol). $R_f = 0.45$ (Aceton/Cyclohexan/Triethylamin 90:10:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 11.75 (s, 1H, -NH), 8.00 (s, 1H, H-6), 7.42 – 7.40 (m, 2H, Trityl-H), 7.34 – 7.28 (m, 6H, Trityl-H), 7.25 – 7.21 /m, 1H, Trityl-H), 6.91 – 6.89 (m, 4H, Trityl-H), 5.74 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, H-1'), 5.45 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, 2'-OH), 5.13 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.19 (q, $^3J = 5.4$ Hz, 1H, H-2'), 4.03 (q, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, H-3'), 3.98 – 3.95 (m, 1H, H-4'), 3.74 (s, 6H, -OCH₃), 3.23 – 3.15 (m, 2H, H-5'/5'') ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 160.44, 158.12, 150.32, 144.71, 144.44, 135.45, 135.36, 129.70, 127.97, 127.65, 126.73, 113.31, 88.57, 85.85, 83.13, 73.18, 70.01, 63.54, 55.06 ppm. MS (ESI): m/z: 673.10 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{IN}_2\text{O}_8\text{Na}$ [M + Na⁺]: 695.08608; gefunden 695.08634.

5'-O-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-5-ioduridin (**32**)



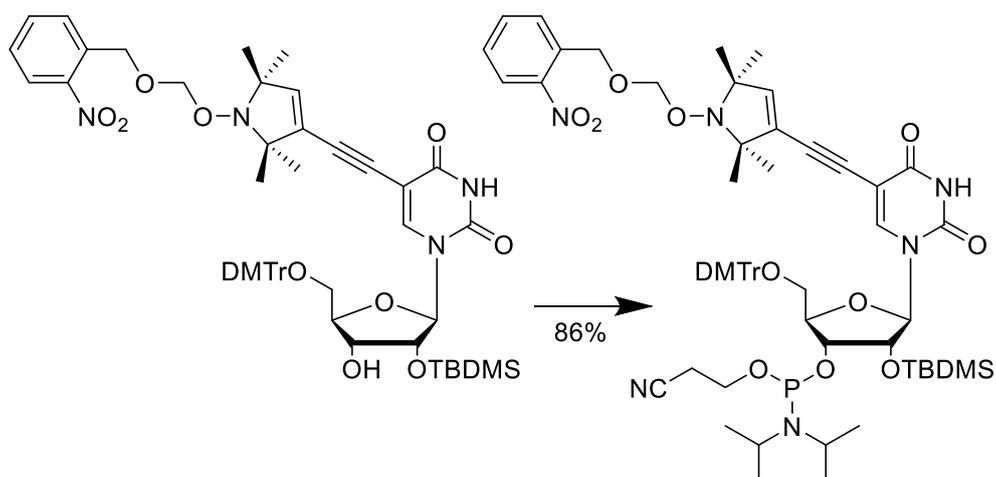
Verbindung **14** (10.00 g, 14.87 mmol, 1.0 eq.) und Imidazol (8.10 g, 118.97 mmol, 8.0 eq.) wurden in 250 mL trockenem Dimethylformamid gelöst, gefolgt von der langsamen Zugabe von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (3.59 g, 23.79 mmol, 1.6 eq.). Die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Reaktionslösung wurden 250 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben, die Phasen getrennt und dreifach mit Dichlormethan (je 150 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde unter vermindertem Druck eingengt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur), nachdem diese zuvor über Magnesiumsulfat getrocknet wurde. Reinigung mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton 3:1 + 1% Triethylamin) lieferte einen farblosen Schaum (32%, 3.70 g, 4.70 mmol). Das 3'-O-TBDMS Isomer sowie das zweifach silylierte Produkt konnte durch Entschützung mit 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran und anschließende säulenchromatographische Reinigung (Aceton/Cyclohexan/Triethylamin 90:10:1) wieder in Verbindung **32** überführt werden. $R_f = 0.25$ (Cyclohexan/Aceton 3:1 + 1% Triethylamin). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 11.81 (bs, 1H, -NH), 8.05 (s, 1H, Pyrimidin-H), 7.41 – 7.39 (m, 2H, Trityl-H), 7.34 – 7.28 (m, 6H, Trityl-H), 7.25 – 7.22 (m, 1H, Trityl-H), 6.91 – 6.89 (m, 4H, Trityl-H), 5.81 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, H-1'), 5.14 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.31 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, H-2'), 4.02 – 4.00 (m, 1H, H-4'), 3.98 – 3.95 (m, 1H, H-3'), 3.74 (s, 6H, -OCH₃), 3.23 – 3.22 (m, 2H, H-5'/5''), 0.84 (s, 9H, -SiC(CH₃)₃), 0.05 (s, 3H, -SiCH₃), 0.03 (s, 3H, -SiCH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 160.45, 158.25, 150.34, 144.76, 143.86, 143.84, 135.32, 135.28, 129.82, 128.39, 128.09, 127.61, 126.93, 126.91, 113.42, 87.89, 86.13, 83.71, 75.53, 70.23, 70.03, 63.35, 55.16, 31.48, 25.65, 17.96, -4.76, -5.15 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, DMSO-d_6): 21.62 ppm. MS (ESI): m/z : 785.46 [M - H⁺]. HRMS: errechnet für C₃₆H₄₃I N₂O₈SiNa [M + Na⁺]: 809.17256; gefunden 809.17511.

Uridin–Nucleosid mit TBDMS–Schutzgruppe und geschütztem Spinlabel (33)



Zu einer Lösung aus Verbindung **32** (2.00 g, 2.54 mmol, 1.0 eq.) und Alkin **2** (840 mg, 2.54 mmol, 1.0 eq.) in 25 mL trockenem Dimethylformamid wurde Triethylamin (2.6 mL, 18.5 mmol, 7.2 eq.), Kupfer(I) iodid (116 mg, 610 μmol , 0.24 eq.) and Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (352 mg 305 μmol , 0.12 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 21 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit Wasser und Dichlormethan verdünnt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase viermal mit Dichlormethan (je 50 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Säulenchromatographische Reinigung (Cyclohexan/Aceton 3:1 + 1% Triethylamin) des Rückstandes ergab Verbindung **33** als weißen Schaum (78%, 1.95 g, 1.97 mmol). $R_f = 0.29$ (Cyclohexan/Aceton 3:1 + 1% Triethylamin). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 11.78 (bs, 1H, –NH), 8.09 (d, 3 J = 8.2 Hz, Nitrophenyl H–3), 8.04 (s, 1H, Pyrimidin–H), 7.77 (m, 2H, Nitrophenyl H–5, H–6), 7.60 – 7.56 (m, 1H, Nitrophenyl H–4), 7.41 – 7.39 (m, 2H, Trityl–H), 7.29 – 7.25 (m, 6H, Trityl–H), 7.20 – 7.16 (m, 1H, Trityl–H), 6.86 – 6.83 (m, 4H, Trityl–H), 5.80 (d, $^3J = 4.7$ Hz, 1H, H–1'), 5.28 (bs, 1H, Pyrrol–H), 5.13 (d, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, 3'–OH), 4.99 (s, 2H) und 4.89 (s, 2H, Nitrophenyl–CH₂–O– und –O–CH₂–O–), 4.33 (t, $^3J = 4.5$ Hz, 1H, H–2'), 4.03 – 4.00 (m, 2H, H–3', H–4'), 3.72 – 3.70 (m, 6H, –OCH₃), 3.29 – 3.19 (m, 2H, H–5'/5''), 1.08 – 0.92 (m, 12H, Pyrrol–CH₃), 0.85 (s, 9H, –SiC(CH₃)₃), 0.06 (s, 3H, –SiCH₃), 0.05 (s, 3H, –SiCH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 161.09, 158.08, 149.43, 147.07, 144.59, 142.03, 139.00, 135.33, 135.26, 133.97, 133.75, 130.12, 129.60, 129.55, 128.63, 128.59, 127.86, 127.53, 126.73, 126.38, 124.60, 113.21, 99.68, 98.90, 88.47, 86.88, 86.01, 84.13, 83.43, 75.87, 70.71, 69.63, 68.40, 66.67, 54.95, 25.59, 17.88, –4.82, –5.18 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, DMSO-d_6): 21.57 ppm. MS (ESI): m/z: 990.77 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₅₄H₆₅N₄O₁₂Si [M + H⁺]: 989.43628; gefunden 989.43555.

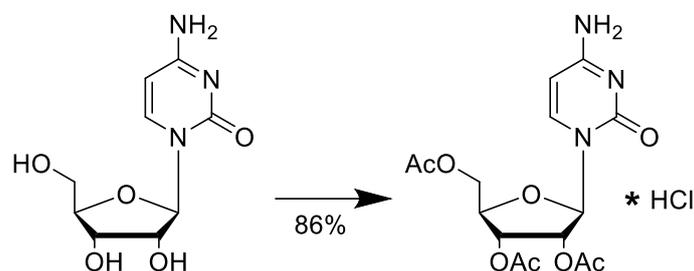
Phosphoramidit-Baustein auf Uridin-Basis mit TBDMS-Schutzgruppe (34)



Zu einer Lösung aus Verbindung **33** (1.82 g, 1.84 mmol, 1.0 eq.) in 60 mL trockenem Dichlormethan wurden Triethylamin (1.60 mL, 9.20 mmol, 5.0 eq.) und Chlor(diisopropylamino)- β -cyanoethoxyphosphin (871 mg, 3.68 mmol, 2.0 eq.) nacheinander zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gequenchet. Nach 10 min wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Reinigung mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton 1:4 + 1% Triethylamin) ergab das gewünschte Phosphoramidit **34** als farblosen Schaum (86%, 1.89 g, 1.59 mmol). R_f = 0.21, 0.18 (Cyclohexan/Aceton 1:4 + 1% Triethylamin, Gemisch aus zwei Diastereomere). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 ; zwei Diastereomere): 11.76 (bs, 1H, -NH), 8.09 (m, 2H, Nitrophenyl H-3 und Pyrimidin-H), 7.78 (m, 2H, Nitrophenyl H-5, H-6), 7.61 – 7.55 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 7.42 – 7.38 (m, 2H, Trityl-H), 7.30 – 7.26 (m, 6H, Trityl-H), 7.21 – 7.17 (m, 1H, Trityl-H), 6.86 – 6.83 (m, 4H, Trityl-H), 5.92 (d, 3J = 6.6 Hz) und 5.84 (d, 3J = 5.8 Hz, zusammen 1H, H-1'), 5.27 (s) und 5.26 (s, zusammen 1H, Pyrrol-H), 4.99 (s, 2H) und 4.88 (s, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$ und $\text{-O-CH}_2\text{-O-}$), 4.54 (m,) und 4.49 (t, 3J = 5.3 Hz, zusammen 1H, H-2'), 4.25 – 4.16 (m, 1H, H-4'), 4.13 – 4.08 (m, 1H, H-3'), 3.84 – 3.74 (m, 2H, $\text{-PO-CH}_2\text{-}$), 3.70 – 3.69 (m, 6H, -OCH_3), 3.55 – 3.50 (m, 2H, Isopropyl-H), 3.43 – 3.16 (m, 2H, H-5'), 2.78 – 2.75 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CN}$), 1.11 – 0.92 (m, 24H, 4 Pyrrol- CH_3 und 4 Isopropyl- CH_3), 0.86 (s) und 0.84 (s, zusammen 9H, $\text{-SiC(CH}_3)_3$), 0.08 und 0.05 und 0.03 (s, zusammen 6H, -SiCH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 177.35, 160.93, 160.80, 158.20, 158.15, 149.47, 147.05, 139.32, 139.22, 135.13, 134.96, 134.87, 133.95, 133.74, 129.63, 129.58, 129.48, 128.61, 128.58, 128.27, 127.90, 127.85, 127.55, 127.54, 127.40, 126.84, 126.29, 126.27, 124.59, 118.66, 113.24, 113.19, 99.67, 99.37, 87.09, 86.97, 86.47, 86.38, 83.70, 70.67, 68.40, 66.66, 64.31, 54.95,

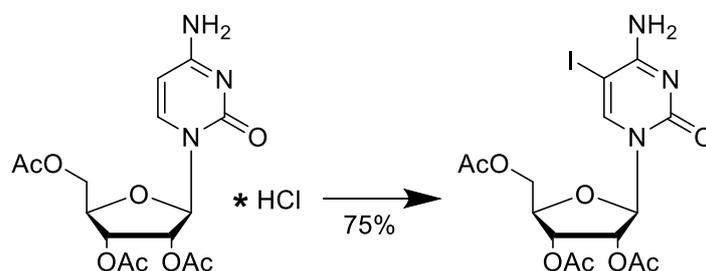
25.50, 25.46, 24.43, 24.37, 24.28, 24.22, 24.17, 19.78, 17.70, 17.63, -4.91, -5.19 ppm. ^{29}Si -NMR (80 MHz, DMSO- d_6): 22.67, 21.74 ppm. ^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): 149.55, 148.43 ppm. HRMS: errechnet für $\text{C}_{63}\text{H}_{81}\text{KN}_6\text{O}_{13}\text{PSi}$ [$\text{M} + \text{K}^+$]: 1227.50056; gefunden 1227.49949.

2',3',5'-Tri-O-acetylcytidinhydrochlorid (36)



Das Cytidin (**35**) (10.00 g, 41.12 mmol, 1.0 eq.) wurde in 65 mL Eisessig gelöst und Acetylchlorid (10.30 mL, 143.90 mmol, 3.50 eq.) langsam dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde aus Ethanol umkristallisiert. Es wurde ein weißer kristalliner Feststoff (14.41 g, 35.52 mmol, 86%) erhalten. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN): 9.51 (bs, 1H, -NH), 8.25 (bs, 1H, -NH), 7.82 (d, ³J = 7.9 Hz, 1H, H-6) 6.24 (d, ³J = 7.9 Hz, H-5), 5.96 (d, ³J = 4.8 Hz, H-1'), 5.41 (m, 1H, H-2'), 5.31 (t, ³J = 5.4 Hz, 1H, H-3'), 4.42 – 4.36 (m, 1H, H-4'), 4.30 – 4.29 (m, 2H, H-5'/5''), 2.07 – 1.94 (m, 9H, dreimal -OAc) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃CN): 171.21, 170.62, 170.53, 161.91, 147.56, 145.41, 95.75, 89.49, 81.54, 74.13, 70.77, 63.81, 21.06, 20.73, 20.64, ppm. MS (ESI): m/z: 370.06 [M + H⁺].

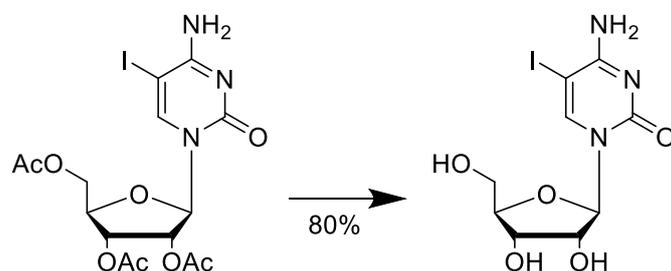
2',3',5'-Tri-O-acetyl-5-iodcytidin (37)



Die Synthese orientiert sich an einer von Piton *et al.*³⁰⁷ publizierten Methode.

Der acetylierte Zucker **36** (10.00 g, 24.64 mmol, 1.0 eq.) wurde in einer Lösung aus Iod 3.75 g, 14.79 mmol, 0.6 eq.) in 180 mL Eisessig suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf 40 °C erhitzt, die Iodsäure (3.90 g, 22.18 mmol, 0.9 eq.) zugegeben und für 62 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 200 mL Dichlormethan aufgenommen, filtriert und einmal mit 250 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol: 25:1 auf 9:1). Die Zielverbindung konnte als weißer Feststoff (9.16 g, 18.50 mmol, 75%) isoliert werden. $R_f = 0,80$ (Dichlormethan/Methanol 9:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 8.07 (s, 1H, H-6), 8.02 (bs, 1H, -NH), 6.80 (bs, 1H, -NH), 5.80 (d, $^3J = 4.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.47 – 5.44 (m, 1H, H-2'), 5.38 – 5.35 (m, 1H, H-3'), 4.34 – 4.31 (m, 1H, H-5'/5''), 4.23 – 4.18 (m, 2H, H-4/H-5'/5''), 2.07 – 2.05 (m, 9H, dreimal -OAc) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 170.00, 169.35, 164.05, 153.53, 148.60, 89.77, 78.92, 72.44, 69.73, 63.01, 57.71, 20.63, 20.27, 18.53 ppm. MS (ESI): m/z: 495.99 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{IN}_3\text{O}_8\text{Na}$ [M + Na⁺]: 518.00308; gefunden 518.00236.

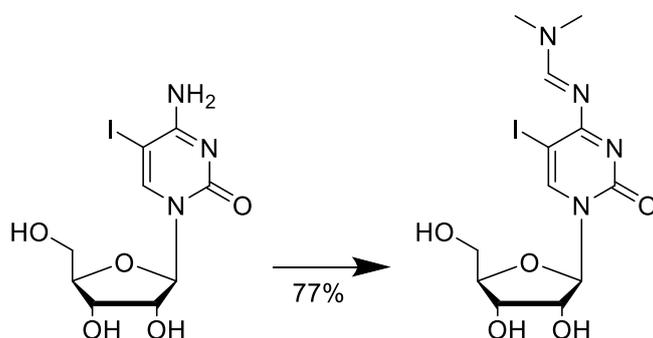
5-Iodcytidin (38)



Die Synthese orientiert sich an einer von Meneghesso *et al.*³⁰⁶ publizierten Methode.

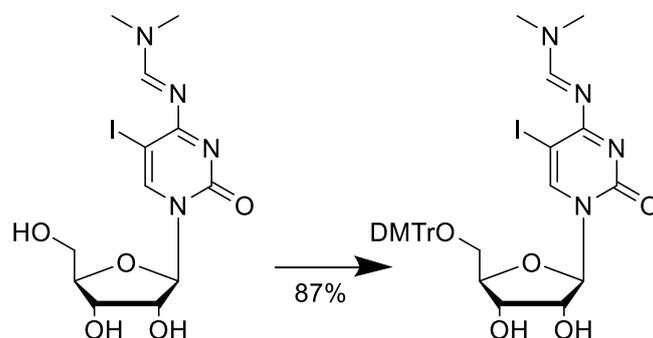
Zu einer Lösung aus Verbindung **37** (7.61 g, 15.37 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL trockenem Methanol wurde eine Lösung aus Natriummethoxid (5.40 M, 8.5 mL, 46.1 mmol, 3.0 eq.) in Methanol zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 120 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Dowex® 50WX8 50 – 100(H) neutralisiert. Der Feststoff wurde filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert und so die Zielverbindung als farbloser Feststoff (80%, 4.50 g, 12.19 mmol) erhalten. Smp.: Zersetzung oberhalb von 205 °C. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD-d₃): 8.65 (s, 1H, H-6), 5.84 (d, ³J = 2.8 Hz, 1H, H-1'), 4.17 – 4.10 (m, 2H, H-2'/3'), 4.05 – 4.02 (m, 1H, H-4'), 3.93 (dd, ³J = 12.3 MHz, ⁴J = 2.4 MHz, 1H, H-5'/5''), 3.76 (dd, ³J = 12.3 MHz, ⁴J = 2.4 MHz, 1H, H-5'/5'') ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD-d₃): 164.43, 156.03, 148.03, 91.03, 84.24, 74.97, 68.62, 59.72, 55.38 ppm. MS (ESI): m/z: 369.94 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₉H₁₂I N₃O₅Na [M + Na⁺]: 391.97138; gefunden 391.97128.

N-[(Dimethylamino)methylen]-5-iodocytidin (39)



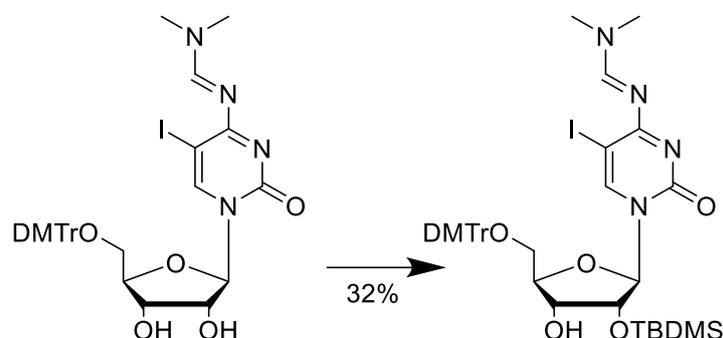
Zu einer Lösung aus 5-Iodcytidin **38** (4.40 g, 11.92 mmol, 1.0 eq.) in 30 mL trockenem Dimethylformamid wurde Dimethylformamiddimethylacetal (7.95 mL, 59.60 mmol, 5.00 eq.) zugeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Für das vollständige Entfernen überschüssigen Dimethylformamids wurde mehrfach mit Toluol evaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 9:1) Das Zielprodukt wurde als Schaum mit einem leichten Gelbstich (77%, 3.90 g, 9.19 mmol) erhalten. $R_f = 0,45$ Dichlormethan/Methanol 9:1. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 8.59 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$), 8.56 (s, 1H, H-6), 5.73 (d, $^3J = 3.0$ Hz, 1H, H-1'), 5.41 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, 2'/3'-OH), 5.23 (t, $^3J = 4.6$ Hz, 1H, 5'-OH), 4.98 (d, $^3J = 5.3$ Hz, 1H, 2'/3'-OH), 3.99 – 3.94 (m, 2H, H-2'/3'), 3.88 – 3.86 (m, 1H, H-4'), 3.73 (ddd, $^3J = 12.0$ Hz, $J = 4.4, 2.7$ Hz, 1H, H-5'/5''), 3.57 (ddd, $^3J = 12.1$ Hz, $J = 4.4, 2.7$ Hz, 1H, H-5'/5''), 3.20 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.12 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 168.02, 158.33, 154.39, 147.67, 89.79, 83.98, 74.44, 68.66, 68.62, 59.66, 40.87, 34.90 ppm. MS (ESI): m/z : 424.96 $[\text{M} + \text{H}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{IN}_4\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}^+]$: 425.03164; gefunden 425.03143.

5'-O-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-N-[(dimethylamino)methylen]-5-iodcytidin (40)



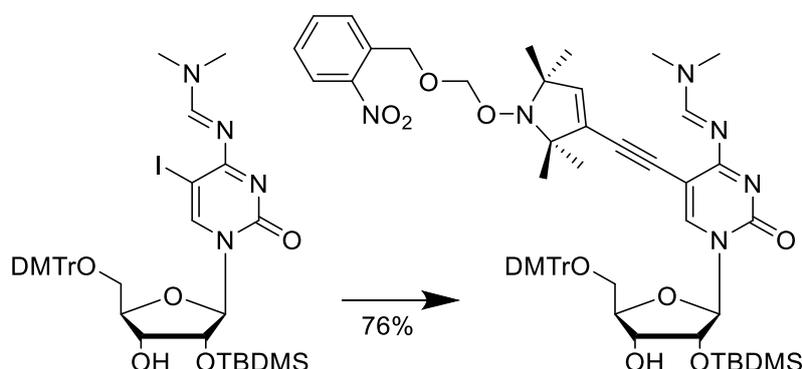
Zu einer Lösung des Amidins **39** (7.56 g, 17.82 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL trockenem Pyridin wurde über einen Zeitraum von 30 min 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (6.94 g, 20.50 mmol, 1.15 eq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Pyridin anschließend unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Der Rückstand wurde mehrfach mit Toluol evaporiert, um ihn dann in Ethylacetat und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung aufzunehmen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit je 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen. Danach wurde die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 98:2 + 1% Triethylamin). Das Produkt wurde als leicht gelblicher Schaum (88%, 11.32 g, 15.58 mmol) erhalten. $R_f = 0.6$ Dichlormethan/Methanol 95:5 + Triethylamin. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 8.61 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$), 8.13 (s, 1H, H-6), 7.46 – 7.44 (m, 2H, Trityl-H), 7.35 – 7.31 (m, 6H, Trityl-H), 7.25 – 7.21 (m, 1H, Trityl-H), 6.92 – 6.90 (m, 4H, Trityl-H), 5.85 (d, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, H-1'), 5.52 (bs, 1H, 2'-OH), 5.13 (bs, 1H, 3'-OH), 4.19 – 4.15 (m, 1H, H-2'), 4.10 – 4.03 (m, 2H, H-3'/4'), 3.74 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3.29 – 3.23 (m, 2H, H-5'/5''), 3.20 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.12 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 168.15, 158.43, 158.12, 158.10, 154.45, 146.70, 144.76, 135.52, 135.43, 129.73, 128.27, 127.95, 127.69, 126.70, 113.30, 89.98, 85.82, 82.67, 74.05, 69.84, 69.28, 63.37, 55.04, 45.68, 40.91, 34.94, 11.22 ppm. MS (ESI): m/z : 727.00 $[\text{M} + \text{H}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{IN}_4\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 749.14426; gefunden 749.14364.

5'-O-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-N-[(dimethylamino)methylen]-2'-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-5-iodcytidin (41)



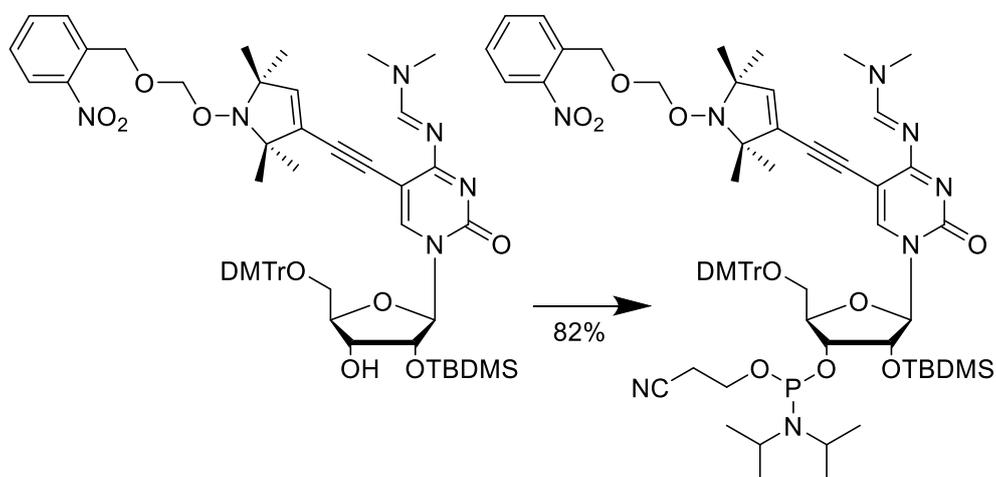
Verbindung **40** (10.00 g, 13.76 mmol, 1.0 eq.) und Imidazol (7.50 g, 110.11 mmol, 8.0 eq.) wurden in 250 mL trockenem Dimethylformamid gelöst, gefolgt von der langsamen Zugabe von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (3.32 g, 22.02 mmol, 1.6 eq.). Die Reaktionslösung wurde für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Reaktionslösung wurden 250 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und dreifach mit Dichlormethan (je 150 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde unter vermindertem Druck eingeeengt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur), nachdem diese zuvor über Magnesiumsulfat getrocknet wurde. Reinigung mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton 4:1 + 1% Triethylamin) lieferte einen farblosen Schaum (32%, 3.67 g, 4.36 mmol). Das 3'-O-TBDMS Isomer sowie das zweifach silylierte Produkt konnte durch Entschützung mit 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran und anschließende säulenchromatographische Reinigung (Dichlormethan/Methanol 98:2 + 1% Triethylamin) wieder in Verbindung **40** überführt werden. $R_f = 0.15$ (Cyclohexan/Aceton 4:1 + 1% Triethylamin). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): 8.62 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$), 8.13 (s, 1H, H-6), 7.49 – 7.46 (m, 2H, Trityl-H), 7.39 – 7.36 (m, 6H, Trityl-H), 7.25 – 7.21 (m, 1H, Trityl-H), 6.89 – 6.87 (m, 4H, Trityl-H), 5.92 (d, $^3J = 4.2$ Hz, 1H, H-1'), 4.39 – 4.37 (m, 1H, H-2'), 4.21 – 4.17 (m, 1H, H-3'), 4.10 – 4.07 (m, 1H, H-4'), 3.76 (s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3.37 – 3.29 (m, 2H, H-5'/5''), 3.19 – 3.18 (m, 1H, 3'-OH), 3.16 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.13 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 0.90 (s, 9H, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.11 – 0.10 (m, 6H, $-\text{SiCH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): 169.55, 159.74, 159.65, 156.01, 147.54, 145.91, 136.79, 136.64, 131.09, 131.05, 129.29, 129.04, 129.00, 127.92, 114.26, 90.24, 87.58, 84.21, 77.59, 71.73, 69.76, 64.18, 55.96, 55.95, 41.90, 35.75, 26.17, 18.80, -4.45, -4.69 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, CD_3CN): 23.51 ppm. MS (ESI): m/z : 841.25 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{I}\text{N}_4\text{O}_7\text{SiNa}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 863.23074; gefunden 863.23024.

Cytidin-Nukleosid mit TBDMS-Schutzgruppe und geschütztem Spinlabel (42)



Zu einer Lösung des Zuckers **41** (1.50 g, 1.78 mmol, 1.0 eq.) und Alkins **2** (589.3 mg, 1.78 mmol, 1.0 eq.) in 15 mL trockenem Dimethylformamid wurden Triethylamin (1.78 mL, 12.84 mmol, 7.2 eq.) Kupfer(I)iodid (81.5 mg, 0.43 mmol, 0.25 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (247.4 mg, 0.21 mmol, 0.12 eq.) zugegeben und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit je 50 mL Wasser und Dichlormethan verdünnt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Der Rückstand wurde mehrfach mit Toluol evaporiert und säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Methanol 49:1 + 1% Triethylamin). Das Produkt konnte als farbloser Schaum (76%, 1.41 g, 1.35 mmol) isoliert werden. $R_f = 0,45$ (Ethylacetat/Methanol 49:1 + 1% Triethylamin). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3CN): 8.69 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$), 8.18 (s, 1H, H-6), 8.07 – 8.05 (m, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.80 – 7.79 (m, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.73 – 7.70 (m, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.54 – 7.52 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 7.48 – 7.47 (m, 2H, Trityl-H), 7.38 – 7.37 (m, 4H, Trityl-H), 7.30 – 7.28 (m, 2H, Trityl-H), 7.22 – 7.20 (m, 1H, Trityl-H), 6.86 – 6.83 (m, 4H, Trityl-H), 5.92 (d, $^3J = 4.3$ Hz, 1H, H-1'), 5.04 – 5.03 (m, 3H, Pyrrol-H und $-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.93 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.41 (t, $^3J = 4.5$ Hz, 1H, H-2'), 4.27 (q, $^3J = 5.1$ Hz, 1H, H-3'), 4.10 – 4.08 (m, 1H, H-4'), 3.74 (d, $^3J = 3.0$ Hz, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3.37 – 3.32 (m, 2H, H-5'/5''), 3.17 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.10 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.08 (d, $^3J = 5.7$ Hz, 1H, 3'-OH), 1.20 – 1.11 (m, 12H, Pyrrol- CH_3), 0.91, (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$), 0.11 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3CN): 171.23, 159.70, 159.67, 159.23, 155.23, 148.55, 145.85, 145.51, 138.87, 136.91, 136.65, 135.29, 134.79, 132.72, 131.06, 130.98, 130.89, 128.99, 128.41, 127.97, 125.65, 114.19, 101.20, 99.82, 91.07, 90.75, 90.23, 87.85, 87.63, 87.38, 84.47, 84.02, 83.72, 78.38, 78.20, 77.77, 72.24, 69.68, 68.12, 63.80, 56.39, 56.31, 55.91, 55.51, 55.44, 41.91, 35.65, 26.19, 26.15, 23.42, 18.83, -4.48, -4.78 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, CD_3CN): 23.56 ppm. MS (ESI): m/z: 1043.52 $[\text{M} + \text{H}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{57}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{SiNa}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 1065.47640; gefunden 1065.47554.

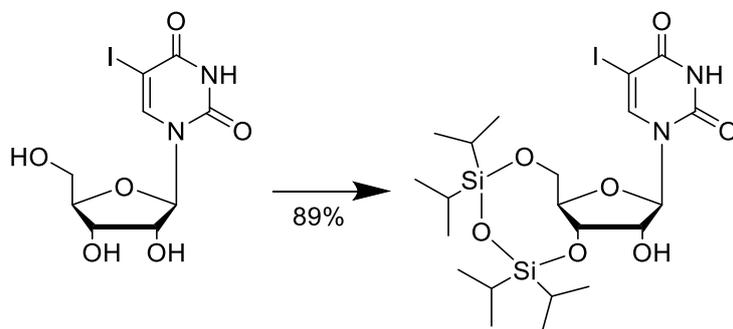
Phosphoramidit-Baustein auf Cytidin-Basis mit TBDMS-Schutzgruppe (43)



Zu einer Lösung aus Verbindung **42** (1.29 g, 1.24 mmol, 1.0 eq.) in 40 mL trockenem Dichlormethan wurden Triethylamin (1.08 mL, 6.20 mmol, 5.0 eq.) und Chlor(diisopropylamino)- β -cyanoethoxyphosphin (587 mg, 2.48 mmol, 2.0 eq.) nacheinander zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gequenchet. Nach 10 min wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Reinigung mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton 6:4 + 1% Triethylamin) ergab das gewünschte Phosphoramidit **43** als gelblichen Schaum (82%, 1.27 g, 1.02 mmol). R_f = 0.10, 0.28 (Cyclohexan/Aceton 6:4 + 1% Triethylamin, Gemisch aus zwei Diastereomere). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 8.68 (s, 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$), 8.22 (s, 1H, H-6), 8.09 (d, 3J = 8.1 Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.80 – 7.76 (m, 2H, Nitrophenyl H-5/6), 7.61 – 7.57 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 7.44 – 7.41 (m, 2H, Trityl-H), 7.32 – 7.27 (m, 6H, Trityl-H), 7.22 – 7.18 (m, 1H, Trityl-H), 6.87 – 6.84 (m, 4H, Trityl-H), 5.96 (d, 3J = 5.9 Hz, 1H, H-1'), 4.99 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.96 (s, 1H, Pyrrol-H), 4.89 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4.47 (t, 3J = 5.4 Hz, 1H, H-2'), 4.25 – 4.23 (m, 1H, H-4'), 4.15 – 4.10 (m, 1H, H-3'), 3.72 – 3.69 (m, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3.60 – 3.48 (m, 4H, $-\text{PO}-\text{CH}_2-$ und 2 Isopropyl-H), 3.40 – 3.26 (m, 2H, H-5'/5'' durch Wassersignal teilweise verdeckt), 3.21 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 3.08 (s, 3H, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 2.52 – 2.48 (m, 2H, $\text{CN}-\text{CH}_2-$ durch Lösemittelsignal verdeckt aber Kreuzpeak im COSY-H), 1.13 – 1.03 (m, 24H, 4 Pyrrol- CH_3 und 4 Isopropyl- CH_3), 0.82 (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$), 0.01 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 169.38, 158.96, 158.14, 153.52, 147.14, 144.52, 144.11, 137.66, 135.25, 134.00, 133.76, 129.75, 129.65, 128.72, 128.66, 128.34, 127.90, 127.62, 126.81, 124.64, 118.56, 113.21, 99.69, 98.63, 87.98, 86.51, 86.44, 86.19, 70.78, 68.34, 66.68, 57.84, 57.66, 55.02,

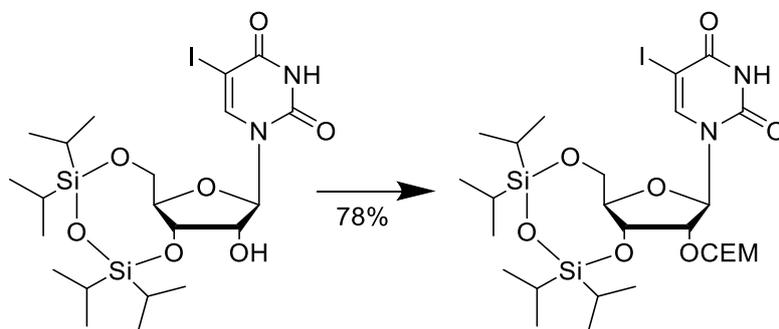
42.81, 42.68, 41.06, 34.80, 25.59, 24.54, 24.47, 24.35, 24.29, 19.70, 17.74, -4.98, -5.08 ppm. ^{29}Si -NMR (80 MHz, DMSO- d_6): 21.50 ppm. ^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): 149.49 ppm. MS (ESI): m/z: 1244.25 [M + H $^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{66}\text{H}_{87}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{SiPNa}$ [M + Na $^+$]: 1265.58425; gefunden 1265.58235.

5-Iod-3',5'-O-[1,1,3,3-tetrakis(1-methylethyl)-1,3-disiloxandiyl]uridin (24)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung des 5-Ioduridins (**13**) (4.60 g, 12.43 mmol, 1.0 eq.) in 55 mL trockenem Pyridin wurde langsam 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan (4.37 mL, 13.67 mmol, 1.1 eq.) zutropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und mit Toluol mehrfach evaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in 100 mL Dichlormethan aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 98:2) gereinigt und das Produkt als leicht gelblicher Schaum (89%, 6.78 g, 11.07 mmol) isoliert. $R_f = 0,38$ Dichlormethan/Methanol 97:3. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): 9.39 (bs, 1H, NH), 7.94 (s, 1H, H-6), 5.57 (s, 1H, H-1'), 4.27 – 4.24 (m, 1H) und 4.19 – 4.13 (m, 2H) und 4.06 – 3.98 (m, 2H) (H-2 bis H-5'/5''), 3.56 (bs, 1H, 2'-OH), 1.13 – 1.04 (m, 28H, 4 Isopropyl-H und 8 Isopropyl- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): 159.99, 149.53, 143.94, 90.40, 81.28, 74.13, 68.39, 67.11, 59.63, 16.97, 16.85, 16.51, 16.33, 16.16, 16.10, 16.07, 16.01, 12.93, 12.47, 12.26, 12.09 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, CD_3CN): -10.17, -11.86 ppm. MS (ESI): m/z : 635.02 [$\text{M} + \text{Na}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{IN}_2\text{O}_7\text{Si}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 635.10762; gefunden 635.10726.

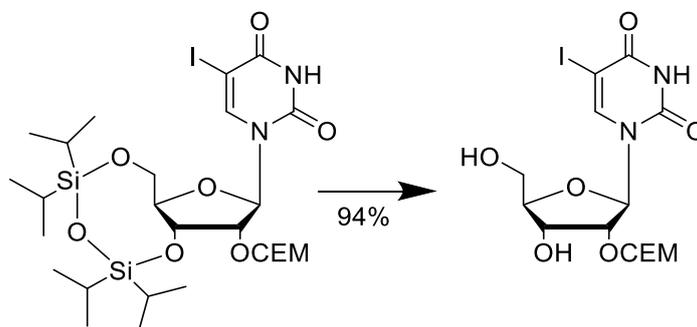
5-Iod-3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-2'-O-(2-cyanoethoxymethyl)uridin (25)



Die Synthese orientiert sich an einer von Ohgi *et al.* publizierten Methode.²⁵⁸

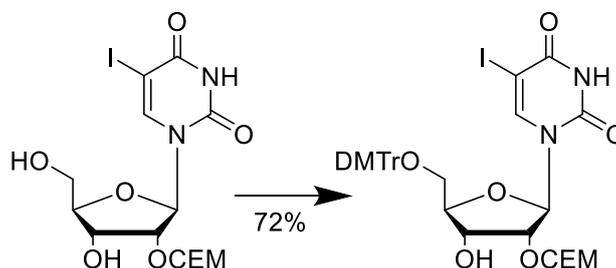
Zu einer auf $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Suspension von 3-[(Methylthio)methoxy]propannitril (2.14 g, 16.33 mmol, 1.5 eq.) und dem Zucker **24** (6.67 g, 10.89 mmol, 1.0 eq.) und 4.3 g Molsieb in 43 mL trockenem Tetrahydrofuran wurde Trifluormethansulfonsäure (1.44 mL, 16.33 mmol, 1.5 eq.) zugetropft. Anschließend wurde das *N*-Iodsuccinimid (3.67 g, 16.33 mmol, 1.5 eq.) in 11 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und langsam zur Reaktionslösung zugegeben. Die Lösung wurde weitere 30 min bei $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann durch die Zugabe von 1 mL Triethylamin beendet. Das Molsieb wurde filtriert und die Lösung mit 100 mL Dichlormethan verdünnt und anschließend sowohl mit je 100 mL gesättigter Natriumthiosulfat- als auch mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 100 mL Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit je 100 mL Wasser, gesättigter Natriumthiosulfatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 30:70) und das gewünschte Produkt als leicht gelblicher Schaum (78%, 5.91 g, 8.50 mmol) isoliert. $R_f = 0.63$ (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): 9.44 (bs, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, H-6), 5.60 (s, 1H, H-1'), 5.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.30 (d, $^3J = 4.6$ Hz, 1H) und 4.26 – 4.19 (m, 2H) und 4.08 (dd, $^3J = 9.5$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H) und 4.00 (dd, $^3J = 13.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz, 1H) (H-2' bis H-5'/5''), 3.82 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 2.72 – 2.61 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 1.13 – 1.03 (m, 28H, 4 Isopropyl-H und 8 Isopropyl- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): 161.32, 150.96, 144.67, 119.52, 94.99, 90.67, 82.78, 78.56, 68.91, 68.49, 63.66, 60.24, 19.24, 18.39, 18.23, 17.82, 17.64, 17.49, 17.39, 14.24, 13.75, 13.57, 13.47 ppm. $^{29}\text{Si-NMR}$ (80 MHz, CD_3CN): -10.35, -11.22 ppm. MS (ESI): m/z : 718.12 [$\text{M} + \text{Na}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{I}\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}_2\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 718.14473; gefunden 718.14427.

5-Iod-2'-O-[(2-Cyanoethoxy)methyl]uridin (26)



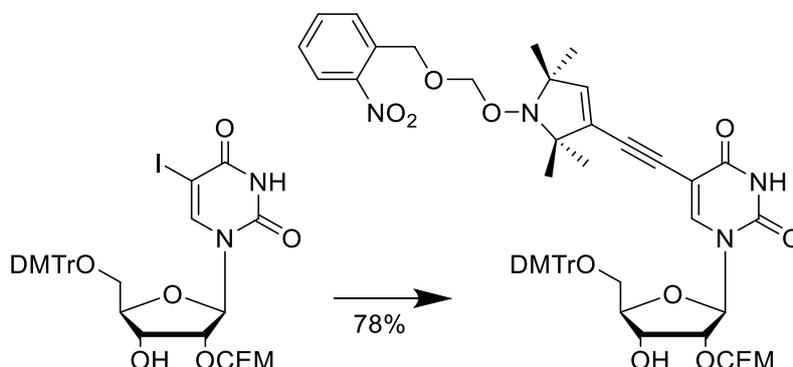
Der silylgeschützte Zucker **25** (5.83 g, 8.38 mmol, 1.0 eq.) wurde zusammen mit Ammoniumfluorid (1.24 g, 33.52 mmol, 4.0 eq.) in 40 mL trockenem Methanol für 5 h auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 40 mL Acetonitril aufgenommen. Der Feststoff wurde filtriert, mit 20 mL Acetonitril gewaschen und die vereinte organische Phase zweimal mit je 50 mL Cyclohexan gewaschen, welche verworfen wurden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 19:1 auf 9:1) und das Produkt als leicht gelblicher Schaum (94%, 3.58 g, 7.90 mmol) isoliert. $R_f = 0,25$ (Dichlormethan/Methanol 19:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): 9.46 (bs, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, H-6), 5.83 – 5.82 (m, 1H, H-1'), 4.91 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.82 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 4.25 – 4.19 (m, 2H, H-2' und H-3'), 3.98 – 3.95 (m, 1H, H-4'), 3.86 (d, $^3J = 12.4$ Hz, 1H, H-5'/5''), 3.81 – 3.70 (m, 3H, H-5'/5'' und $-\text{O}-\text{CH}_2-$), 3.45 (bs, 1H, 5'-OH), 3.32 (bs, 1H, 3'-OH), 2.65 (t, $^3J = 6.1$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CN}$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): 161.26, 151.25, 146.27, 119.60, 95.57, 89.09, 85.64, 80.29, 69.43, 68.41, 64.05, 60.81, 19.35 ppm. MS (ESI): m/z : 475.96 $[\text{M} + \text{Na}^+]$. HRMS: errechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{IN}_3\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 475.99251; gefunden 475.99179.

5'-O-[Bis(4-methoxyphenyl)phenylmethyl]-2'-O-[(2-Cyanoethoxy)methyl]-5-ioduridin (**27**)



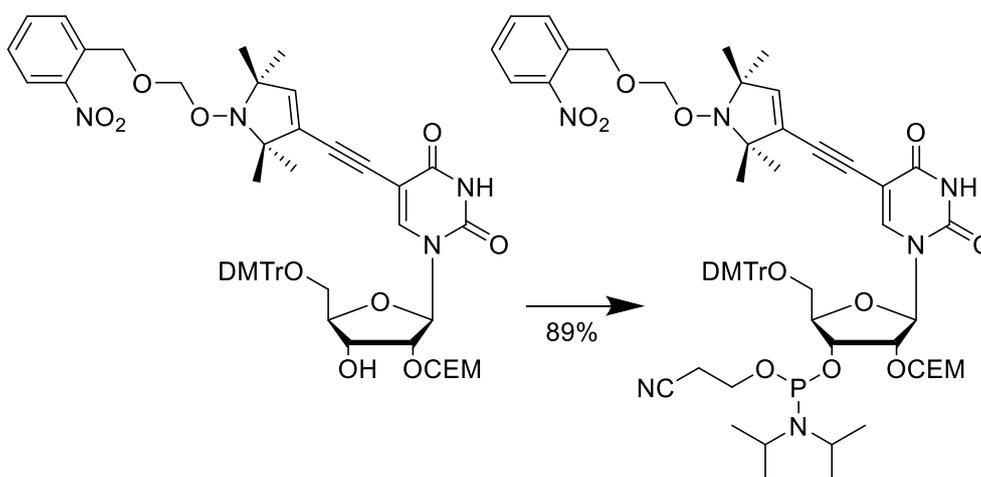
Der Zucker **26** (3.51 g, 7.75 mmol, 1.0 eq.) wurde in 60 mL trockenem Pyridin gelöst und im Abstand von jeweils 30 min wurde ein Drittel des 4,4'-Dimethoxytritylchlorids (3.94 g, 11.62 mmol, 1.5 eq.) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend bei 30 °C unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol mehrfach evaporiert und anschließend in 200 mL Ethylacetat/ gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung 1:1 aufgenommen. Die organische Phase wurde jeweils mit 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung sowie gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (reines Ethylacetat + 1% Triethylamin) und das Produkt als leicht gelblicher Schaum (72%, 4.20 g, 5.58 mmol) isoliert. $R_f = 0.7$ (reines Ethylacetat + 1% Triethylamin). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3CN): 8.02 (s, 1H, H-6), 7.50 – 7.48 (m, 2H, Trityl-H), 7.40 – 7.37 (m, 4H, Trityl-H), 7.34 – 7.30 (m, 2H, Trityl-H), 7.25 – 7.22 (m, 1H, Trityl-H), 6.90 – 6.87 (m, 4H, Trityl-H), 5.88 (d, $^3J = 3.8$ Hz, 1H, H-1'), 4.95 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, -O-CH₂-O-), 4.88 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, -O-CH₂-O-), 4.45 – 4.39 (m, 2H, H-2' und H-3'), 4.08 – 4.06 (m, 1H, H-4' Signal ist durch das Quartett von Ethylacetat überdeckt), 3.83 – 3.76 (m, 8H, zwei -OCH₃ und -O-CH₂-), 3.39 (dd, $^3J = 11.1$ Hz, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-5'/5''), 3.30 (dd, $^3J = 11.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-5'/5''), 2.65 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 2H, -CH₂-CN) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3CN): 161.27, 159.71, 151.30, 150.44, 145.70, 145.11, 137.20, 136.79, 136.53, 129.04, 127.94, 124.85, 119.56, 118.29, 114.26, 95.60, 88.82, 87.56, 84.37, 79.71, 70.14, 69.50, 64.07, 63.49, 55.96, 19.38, 14.52 ppm. MS (ESI): m/z: 777.96 [M + Na⁺]. HRMS: errechnet für C₃₄H₃₄IN₃O₉Na [M + Na⁺]: 778.12319; gefunden 778.12257.

Uridin-Nukleosid mit CEM-Schutzgruppe und geschütztem Spinlabel (29)



Zu einer Lösung des Zuckers **27** (1.50 g, 1.99 mmol, 1.0 eq.) und Alkins **2** (655.9 mg, 1.99 mmol, 1.0 eq.) in 20 mL trockenem Dimethylformid wurden Triethylamin (1.99 mL, 14.29 mmol, 7.2 eq.) Kupfer(I)iodid (90.7 mg, 0.48 mmol, 0.24 eq.) und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (275.3 mg, 0.24 mmol, 0.12 eq.) zugegeben und für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit je 75 mL Wasser und Dichlormethan verdünnt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert, die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Der Rückstand wurde mehrfach mit Toluol evaporiert und säulenchromatographisch gereinigt (Ethylacetat/Dichlormethan 65:35 + 1% Triethylamin auf reines Ethylacetat + 1% Triethylamin). Das Produkt konnte als farbloser Schaum (78%, 1.49 g, 1.56 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.75$ reines Ethylacetat + 1% Triethylamin. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): 11.76 (s, 1H, NH), 8.10 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.99 (s, 1H, H-6), 7.79 – 7.78 (m, 2H, Nitrophenyl H-5 und H-6), 7.61 – 7.59 (m, 1H, H-4), 7.42 – 7.40 (m, 2H, Trityl-H), 7.30 – 7.26 (m, 6H, Trityl-H), 7.20 – 7.18 (m, 1H, Trityl-H), 6.86 – 6.84 (m, 4H, Trityl-H), 5.83 (d, $^3J = 3.8$ Hz, 1H, H-1'), 5.40 (bs, 1H, Pyrrol-H), 5.33 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1H, 3'-OH), 5.01 (s, 2H, Nitrophenyl-CH₂-O-), 4.91 (s, 2H, -O-CH₂-O-N-), 4.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, -O-CH₂-O-), 4.82 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, -O-CH₂-O-), 4.36 – 4.34 (m, 1H, H-2'), 4.29 – 4.25 (m, 1H, H-3'), 4.02 – 4.01 (m, 1H, H-4'), 3.75 – 3.69 (m, 8H, 2 -OCH₃ und -O-CH₂-), 3.26 – 3.20 (m, 2H, H-5'/5''), 2.81 – 2.70 (m, 2H, -CH₂-CN), 1.14 – 0.98 (m, 12H, Pyrrol-CH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): 161.21, 158.04, 149.41, 147.09, 144.52, 138.85, 135.53, 135.37, 133.97, 133.75, 132.04, 131.51, 131.41, 129.61, 129.55, 128.67, 128.65, 128.61, 127.86, 127.64, 126.68, 126.50, 124.61, 119.07, 99.69, 98.78, 94.00, 93.93, 88.01, 87.96, 86.83, 85.83, 84.38, 82.94, 78.04, 70.79, 68.49, 68.44, 66.67, 62.42, 54.94, 22.48, 18.01 ppm. MS (ESI): m/z : 960.87 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₅₂H₅₆N₅O₁₃ [M + H⁺]: 958.38691; gefunden 958.39051.

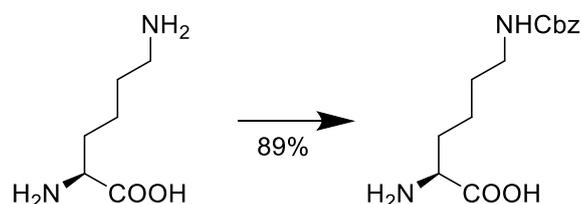
Phosphoramidit-Baustein auf Uridin-Basis mit CEM-Schutzgruppe (31)



Zu einer Lösung aus Verbindung **29** (1.43 g, 1.49 mmol, 1.0 eq.) in 50 mL trockenem Dichlormethan wurden Triethylamin (1.04 mL, 7.47 mmol, 5.0 eq.) und Chlor(diisopropylamino)- β -cyanoethoxyphosphin (707 mg, 2.99 mmol, 2.0 eq.) nacheinander zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gequenchet. Nach 10 min wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit Dichlormethan (je 30 mL) extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (max. 30 °C Wasserbadtemperatur). Reinigung mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Aceton 75:25 + 1% Triethylamin) ergab das gewünschte Phosphoramidit **31** als farblosen Schaum (89%, 1.54 g, 1.33 mmol). R_f = 0.41, 0.55 (Cyclohexan/Aceton 60:40 + 1% Triethylamin, Gemisch aus zwei Diastereomere). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6 , zwei Diastereomere): 11.77 (bs, 1H, NH), 8.10 (d, 3J = 8.2 Hz, 1H, Nitrophenyl H-3), 8.07 (s) und 8.05 (s, zusammen 1H, H-6), 7.79 – 7.78 (m, 2H, Nitrophenyl H-5 und H-6), 7.60 – 7.57 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 7.42 – 7.40 (m, 2H, Trityl-H), 7.31 – 7.26 (m, 6H, Trityl-H), 7.20 – 7.17 (m, 1H, Trityl-H), 6.86 – 6.83 (m, 4H, Trityl-H), 5.87 – 5.86 (m, 1H, H-1'), 5.41 – 5.31 (m, 1H, Pyrrol-H), 5.00 (d, J = 3.5 Hz, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$ und $-\text{O-CH}_2\text{-O-N-}$), 4.91 (d, J = 4.6 Hz, 2H, Nitrophenyl- $\text{CH}_2\text{-O-}$ und $-\text{O-CH}_2\text{-O-N-}$), 4.87 – 4.81 (m, 2H, $-\text{O-CH}_2\text{-O-}$), 4.54 (t, 3J = 4.6 Hz) und 4.50 (t, 3J = 4.6 Hz, zusammen 1H, H-2'), 4.45 – 4.40 (m, 1H, H-3'), 4.17 – 4.15 (m) und 4.13 – 4.11 (m, zusammen 1H, H-4'), 3.79 – 3.69 (m, 9H, 2 $-\text{OCH}_3$ und $\text{PO-CH}_2\text{-}$ bzw. $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 3.67 – 3.63 (m) und 3.60 – 3.55 (m, zusammen 1H, $\text{PO-CH}_2\text{-}$ oder $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 3.53 – 3.46 (m, 2H, Isopropyl-H), 3.40 – 3.32 (m, 1H, H-5'/5''), 3.23 – 3.17 (m, 1H, H-5'/5''), 2.81 – 2.68 (m, 3H, $\text{CN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OP}$ und $\text{CN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 2.57 – 2.54 (m, 1H, $\text{CN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OP}$ oder $\text{CN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 1.12 – 1.02 (m, 20H, Pyrrol- CH_3 und Isopropyl- CH_3), 0.95 (d, J = 6.8 Hz, 4H, Pyrrol- CH_3 und Isopropyl- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6): 161.27, 161.25, 158.16, 149.51, 149.48, 147.14, 144.48, 144.46, 142.49,

142.34, 139.04, 135.45, 135.41, 135.30, 134.07, 133.81, 129.72, 129.70, 129.65, 128.73, 128.70, 127.93, 127.77, 127.70, 126.81, 126.50, 124.69, 119.03, 118.98, 118.79, 113.22, 99.74, 99.13, 99.09, 94.17, 94.02, 88.34, 88.01, 87.05, 87.02, 86.13, 86.06, 84.29, 82.50, 82.11, 77.52, 76.94, 76.92, 70.83, 70.81, 68.53, 68.51, 66.74, 62.72, 58.68, 58.53, 58.23, 58.07, 55.02, 42.73, 42.67, 42.64, 42.58, 28.89, 28.07, 24.46, 24.40, 24.34, 24.31, 24.29, 24.25, 22.92, 22.55, 19.92, 19.87, 19.80, 18.06, 18.03, 14.14, 7.22 ppm. ^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6): 149.62, 148.42 ppm. MS (ESI): m/z: 1158.40 [M + H $^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{61}\text{H}_{73}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}$ [M + H $^+$]: 1158.49476; 1158.49491 gefunden.

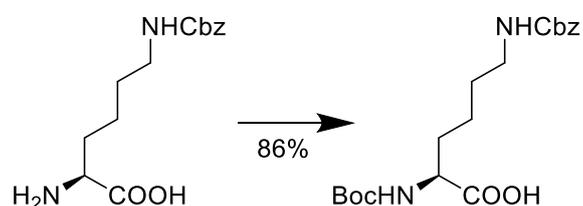
ϵ -(Benzyloxycarbonyl)-L-lysine (46)



Die Synthese orientiert sich an einer von Casadio *et al.*³⁰⁸ publizierten Methode.

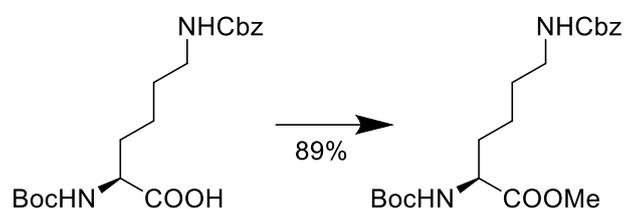
Das Hydrochlorid des L-Lysins (**45**) (5.05 g, 27.65 mmol, 1.0 eq.) wurde in 25 mL einer wässrigen 2 M Kaliumhydroxidlösung gelöst. Nach Zugabe des in 10 mL Wasser gelösten Kupfersulfats (3.46 g, 13.82 mmol, 0.5 eq.) wurde die dunkelblaue Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Natriumhydrogencarbonat (3.25 g, 38.71 mmol, 1.4 eq.) zugegeben und über 20 min Benzylchlorformiat (4.72 mL, 33.18 mmol, 1.2 eq.) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 0 °C und weitere 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Das blaue Präzipitat wurde filtriert und nacheinander mit 100 mL Wasser, 50 mL Aceton und 25 mL Dichlormethan gewaschen. Danach wurde der blaue Feststoff zu einer siedenden Suspension aus Ethylendiamintetraessigsäure (8.39 g, 28.70 mmol, 1.05 eq.) in 60 mL Wasser gegeben und für 90 min zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde durch Zugabe von 2 M KOH ein pH-Wert von sieben eingestellt und der ausfallende Feststoff filtriert, welcher mit Wasser gewaschen wurde. Der weiße Feststoff wurde aus Wasser umkristallisiert. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (89%, 6.90 g, 24.61 mmol) isoliert werden. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 7.29 – 7.24 (m, 5H, Phenyl-H), 4.94 (s, 2H, Phenyl-CH₂-), 3.84 (t, ³J = 6.0 Hz, 1H, α -CH), 2.96 (t, ³J = 6.2 Hz, 2H, ϵ -CH₂), 1.82 – 1.68 (m, 2H, β -CH₂), 1.41 – 1.20 (m, 4H, γ/δ -CH₂) ppm. ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-d₆): 172.54, 158.85, 137.95, 130.10, 129.69, 129.13, 67.50, 53.56, 41.15, 30.64, 29.83, 22.81 ppm. MS (ESI): m/z: 281.14 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₁₄H₂₁N₂O₄ [M + H⁺]: 281.14958; 281.14975 gefunden.

*N*²-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*⁶-benzyloxycarbonyl-*L*-lysine (47)



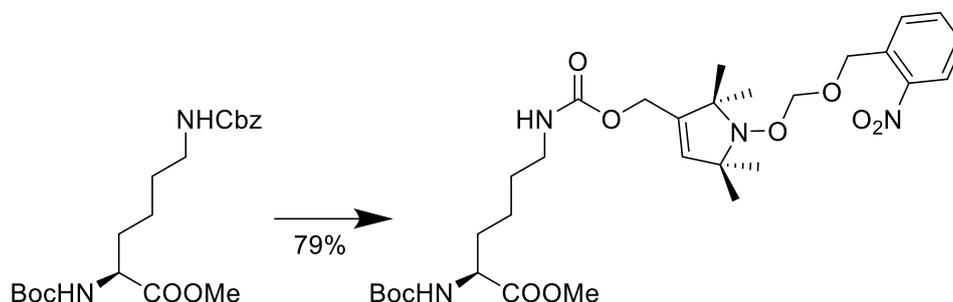
Zu einer Lösung aus KOH (6.06 g, 108.09 mmol, 6.0 eq.) und geschütztem Lysin **46** (5.05 g, 18.02 mmol, 1.0 eq.) in 50 mL Wasser wurde eine Lösung aus Di-*tert*-butyldicarbonat (4.32 g, 19.82 mmol, 1.1 eq.) gelöst in 20 mL 1,4-Dioxan zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, mit verdünnter wässriger Salzsäure auf einen pH-Wert von zwei eingestellt und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert worden. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan/Methanol 19:1) gereinigt. Das Produkt konnte als viskoses farbloses Öl (86%, 5.89 g, 15.48 mmol) erhalten werden. $R_f = 0.63$ (Dichlormethan/Methanol 9:1). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.28 – 7.17 (m, 5H, Phenyl-H), 5.73 – 5.46 (m, 2H, 2 -NH), 5.04 – 4.94 (m, 2H, Phenyl-CH₂-), 4.10 – 4.05 (m, 1H, α-CH), 3.07 – 3.02 (m, 2H, ε-CH₂), 1.76 – 1.61 (m, 1H, β-CH₂), 1.60 – 1.48 (m, 1H, β-CH₂), 1.47 – 1.36 (m, 2H, δ-CH₂), 1.35 – 1.24 (m, 11H, -C(CH₃)₃, γ-CH₂) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 173.62, 157.04, 136.44, 128.36, 127.94, 127.80, 80.03, 79.88, 66.89, 66.50, 53.32, 52.16, 40.47, 40.39, 31.85, 29.09, 28.08, 22.40, 22.36 ppm. MS (ESI): m/z: 381.07 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₁₉H₂₈N₂O₆ [M + Na⁺]: 403.18396; 403.18380 gefunden.

*N*²-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*⁶-benzyloxycarbonyl-*L*-lysinmethylester (48)



Zu einer Lösung der freien Carbonsäure **47** (4.45 g, 11.70 mmol, 1.0 eq.) in 30 mL trockenem Dimethylformamid wurde Kaliumcarbonat (3.23 g, 23.39 mmol, 2.0 eq.) und Methyljodid (1.46 mL, 23.39 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und über Nacht auf 80 °C erhitzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 mL Wasser gequencht. Das Gemisch wurde dreimal mit je 40 mL DCM extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Magnesium getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 6:1 auf 3:1). Das Produkt konnte als leicht gelbliches viskoses Öl (89%, 4.10 g, 10.39 mmol) erhalten werden. $R_f = 0.35$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.38 – 7.27 (m, 5H, Phenyl-H), 5.17 – 5.01 (m, 3H, Phenyl- CH_2 -, BocNH), 4.93 – 4.81 (m, 1H, CbzNH), 4.33 – 4.22 (m, 1H, α -CH), 3.72 (s, 3H, -COOMe), 3.20 – 3.15 (m, 2H, ϵ - CH_2), 1.85 – 1.72 (m, 1H, β - CH_2), 1.70 – 1.57 (m, 1H, β - CH_2), 1.56 – 1.47 (m, 2H, δ - CH_2), 1.42 (s, 9H, Boc- CH_3), 1.40 – 1.31 (m, 2H, γ - CH_2) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 173.37, 156.60, 155.62, 136.73, 128.61, 128.19, 80.05, 66.73, 53.29, 52.37, 40.72, 36.56, 32.45, 29.47, 28.42, 22.50 ppm. MS (ESI): m/z : 394.95 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 417.19961; 417.19941 gefunden.

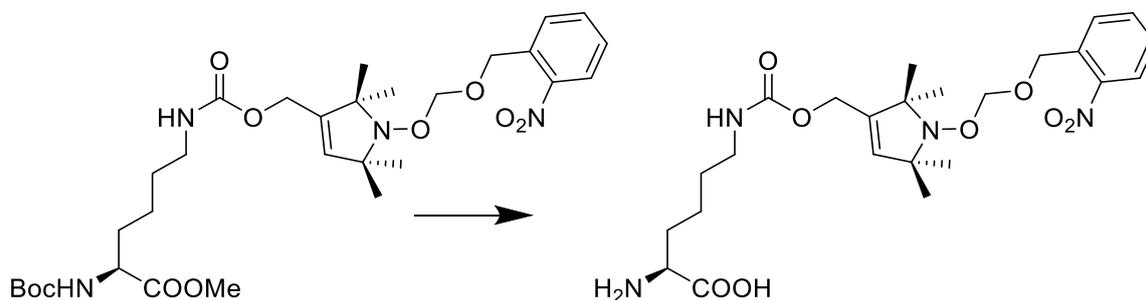
*N*²-[*tert*-Butoxycarbonyl]-*N*⁶-[[[2,2,5,5-tetramethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy] methoxy]-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-3-yl]methoxy]carbonyl]lysine methylester (50)



Der geschützte TPA-Alkohol **44** (0.35 g, 1.04 mmol, 1.0 eq.) wurde zusammen mit Imidazol und Carbonyldiimidazol (219 mg, 1.35 mmol, 1.3 eq.) in 15 mL trockenem Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, bis zum vollständigen Umsatz des Eduktes. Anschließend wurden je 50 mL Wasser und Dichlormethan zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1). Parallel wurde das geschützte Lysin **48** (512 mg, 1.35 mmol, 1.3 eq.) in 10 mL trockenem Methanol gelöst, mit 10 Gew% Palladium auf Aktivkohle (50 mg) versetzt und die Argon- gegen eine Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Feststoff filtrieren und Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass kein Methanol mehr zurückbleibt. Aktivierter Alkohol und entschütztes Lysin wurden in 20 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und Triethylamin (0.3 mL, 2.08 mmol, 2.0 eq) zugeben. Die Reaktionslösung wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchloridlösung wurde die Reaktion gequench und die wässrige Phase anschließend dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) gereinigt. Das Produkt konnte als viskoses, farbloses Öl (79%, 512 mg, 0.82 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.43$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 8.12 – 8.10 (m, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.89 – 7.87 (m, 1H, Nitrophenyl H-6), 7.67 – 7.64 (m, 1H, Nitrophenyl H-5), 7.46 – 7.42 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 5.50 – 5.45 (m, 1H, Pyrrol-H), 5.12 (s, 2H, Nitrophenyl-CH₂-), 5.08 – 5.02 (m, 1H, BocNH), 5.03 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.80 – 4.71 (m, 1H, NH-ε-CH₂), 4.61 – 4.51 (m, 2H, Pyrrol-CH₂-O-), 4.34 – 4.23 (m, 1H, α-CH₂), 3.73 (s, 3H, -COOMe), 3.20 – 3.15 (m, 2H, ε-CH₂), 1.86 – 1.76 (m, 1H, β-CH₂), 1.68 – 1.61 (m, 1H, β-CH₂), 1.57 – 1.47 (m, 2H, δ-CH₂), 1.44 (s, 9H, Boc-CH₃), 1.41 – 1.32 (m, 2H, γ-CH₂), 1.28

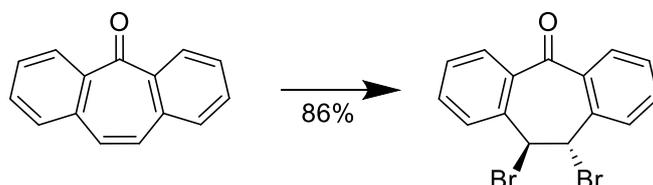
– 1.17 (m, 12H, Pyrrol-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): 173.36, 156.36, 155.59, 147.19, 139.56, 135.15, 133.91, 131.64, 128.74, 128.04, 124.90, 100.62, 80.10, 70.27, 68.01, 67.51, 61.09, 59.64, 53.30, 52.44, 40.82, 32.61, 29.55, 28.47, 27.94, 23.50, 22.97, 22.56 ppm. MS (ESI): m/z: 623.13 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₃₀H₄₆N₄O₁₀ [M + Na⁺]: 645.31061; 645.31022 gefunden.

*N*⁶-[[[2,2,5,5-tetramethyl-1-[[[2-nitrobenzyl]oxy]methoxy]-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-3-yl]methoxy]carbonyl]lysine (51)



Das voll geschützte Lysinderivat **50** (0.48 g, 0.77 mmol, 1.0 eq.) wurde in 20 mL Methanol/Tetrahydrofuran 1:1 gelöst. Anschließend wurden 20 mL 0.5 M Lithiumhydroxidlösung hinzugegeben und die Reaktionslösung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels 1 M Salzsäure angesäuert und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 2 mL Dichlormethan/Trifluoressigsäure 1:1 gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und mehrfach mit Dichlormethan evaporiert. Reinigung mittels RP-Chromatographie. Das Produkt konnte nach dem Entfernen des Puffers unter vermindertem Druck als beiger Feststoff isoliert werden. Eine Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nicht der komplette Ansatz gereinigt wurde. Bedingungen für RP-HPLC: A: 0.1 M Triethylamin, pH-Wert 7.0; B: Acetonitril; Isokratischer Lauf mit 35 Teilen A zu 65 Teilen B bei 9 mL/min und einer Detektion bei 254 nm. Die verwendete Säule stammt von Macherey Nagel, mit der Bezeichnung VP 250/21 NUCLEODUR C18 μ m. ¹H-NMR (300 MHz, AcOD-d₃): 8.12 – 8.07 (m, 1H, Nitrophenyl H-3), 7.84 – 7.75 (m, 2H, Nitrophenyl H-5 und H-6), 7.63 – 7.56 (m, 1H, Nitrophenyl H-4), 7.21 – 7.14 (m, 1H, NH- ϵ -CH₂), 5.49 (s, 1H, Pyrrol-H), 5.02 (s, 2H, Nitrophenyl-CH₂-), 4.95 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.47 (s, 2H, Pyrrol-CH₂-O-), 3.10 – 3.04 (m, 1H, α -CH₂), 2.99 – 2.91 (m, 2H, ϵ -CH₂), 1.74 – 1.63 (m, 1H, β -CH₂), 1.60 – 1.47 (m, 1H, β -CH₂), 1.40 – 1.27 (m, 4H, γ -CH₂ und δ -CH₂), 1.20 – 1.14 (m, 12H, Pyrrol-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (75 MHz, AcOD-d₃): 174.99, 158.56, 148.41, 140.64, 135.62, 134.63, 132.51, 129.61, 129.10, 125.69, 101.29, 71.16, 68.82, 68.18, 62.19, 55.63, 41.16, 30.90, 29.93, 22.84 ppm. MS (ESI): m/z: 509.30 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für C₂₄H₃₆N₄O₈Na [M + Na⁺]: 531.24254; 531.24198 gefunden.

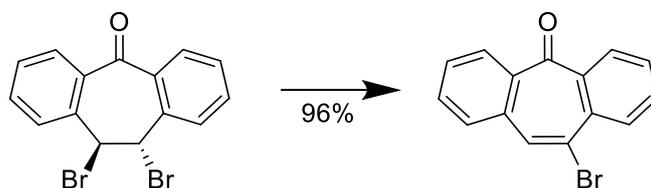
trans-10,11-Dibrom-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*][7]annulen-5-on (rac-54)



Die Synthese orientiert sich an einer von Chung, Schulz *et al.* publizierten Methode.³⁰⁹

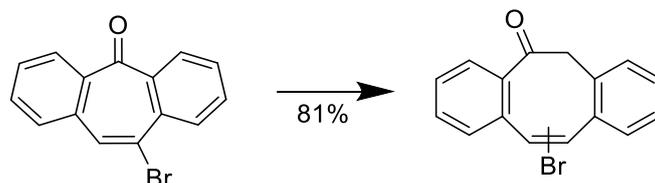
Zu einer Lösung aus 5*H*-Dibenzo[*a,d*][7]annulen-5-on (**53**) (20.8 g, 100.6 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL Chloroform wurde über 2.5 h eine Lösung aus Brom (5.7 mL, 110 mmol, 1.1 eq.) in 45 mL Chloroform zugetropft und weitere 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde filtriert, mit Chloroform gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Feststoff wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff (86%, 31.83 g, 86.95 mmol) in racemischer Form isoliert werden. Smp.: 204 °C (Lit: 192 – 220 °C)^{309,310}. ¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): 8.07 (dd, ³*J* = 7.9 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, 2H, Phenyl-H), 7.68 – 7.56 (m, 6H, Phenyl-H), 6.19 (s, 2H, H-10/11) ppm. ¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-*d*₆): 192.3, 139.0, 138.6, 133.9, 133.3, 132.1, 130.5, 54.1 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.^{309,310} MALDI: errechnet für C₁₅H₁₀Br₂O: 363.91, 365.91, 367.91; 363.9092, 365.9073, 367.9054 gefunden.

10-Brom-5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-on (55)



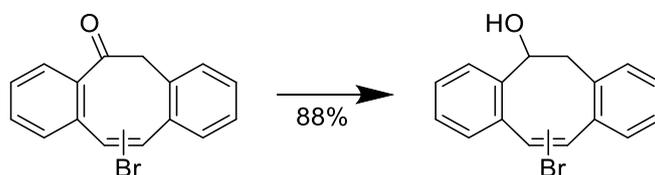
Das Racemat **rac-54** (31.78 g, 86.82 mmol, 1.0 eq.) wurde zusammen mit KOH (24.49 g, 436.5 mmol, 5.0 eq.) in 800 mL Methanol suspendiert. Die Reaktionslösung wurde für 16.5 h zum Sieden erhitzt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach dem Aufnehmen des Rückstands in einem Gemisch von 300 mL Dichlormethan und 200 mL Wasser wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 150 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 200 mL Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Feststoff wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert. Verbindung **55** konnten als leicht gelblicher Feststoff (96%, 23.81 g, 83.50 mmol) isoliert werden. Smp.: 112 °C (Lit: 116 °C)³¹¹. ¹H-NMR (600 MHz, Aceton-*d*₆): 8.17 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 0.6 Hz, 1H, Phenyl-H), 7.95 (s, 1H, Vinyl-H), 7.90 – 7.86 (m, 2H, Phenyl-H), 7.79 – 7.76 (m, 1H, Phenyl-H), 7.72 – 7.61 (m, 4H, Phenyl-H) ppm. ¹³C-NMR (126 MHz, Aceton-*d*₆): 194.7, 140.6, 140.2, 136.6, 134.0, 133.9, 133.1, 132.9, 131.8, 131.4, 131.0, 130.6, 129.7, 129.4 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.^{309,310}

11-Bromodibenzo[a,e][8]annulen-5(6H)-on/12-Bromodibenzo[a,e][8]annulen-5(6H)-on (56a/56b)



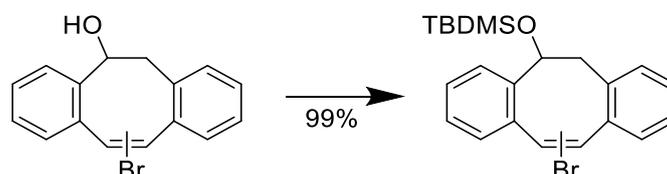
Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung des 7-Rings **55** (2.25 g, 7.89 mmol, 1.0 eq.) und Bortrifluoriddiethyletherat (1.5 mL, 11.84 mmol, 1.5 eq.) in 45 ml trockenem Dichlormethan wurde eine 2 M Trimethylsilyldiazomethanlösung in Diethylether (6.0 mL, 12.0 mmol, 1.5 eq.) zugetropft. Die zunächst rötliche Lösung entfärbte sich zunehmend und nahm eine schwache gelbe Tönung an. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 mL Wasser gequencht und für 90 min zum Sieden erhitzt. Die Phasen des abgekühlten Gemischs wurden getrennt, die wässrige Phase viermal mit je 75 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit 40 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Das Lösungsmittel der über Magnesiumsulfat getrockneten organischen Phase wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das orangefarbene, ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Dichlormethan 3:1) gereinigt. Das Regioisomereingemisch wurde als orangefarbenes Öl (81%, 1.91 g, 6.39 mmol) erhalten. $R_f = 0.24$ (Cyclohexan/Dichlormethan). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , zwei Regioisomere im Verhältnis 1:0.67): 8.08 – 8.07 (m, 0.9H), 7.74 – 7.73 (m, 0.7H), 7.59 – 7.56 (m, 2.4H), 7.52 – 7.51 (m, 1H), 7.47 – 7.42 (m, 1.8H), 7.32 – 7.26 (m, 3.8H), 7.25 – 7.24 (m, 2.1H), 7.21 – 7.16 (m, 2.4H), 4.39 (d, $^3J = 13.2$ Hz, 1H), 4.12 (bs, 1.4H), 3.95 (d, $^3J = 13.2$ Hz, 1H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3 , zwei Regioisomere): 196.97, 137.67, 137.40, 136.45, 135.86, 135.38, 134.94, 134.22, 134.14, 133.87, 133.75, 132.39, 131.96, 131.24, 130.98, 130.72, 130.21, 129.68, 129.51, 129.06, 129.03, 128.73, 128.66, 128.01, 127.58, 127.42, 127.39, 124.13, 122.47, 50.63, 49.13 ppm. Zu analytischen Zwecken wurden die Regioisomere mittels HPLC getrennt. Bedingungen für RP-HPLC: A: 0.1% Trifluoressigsäure, pH-Wert 7.0; B: Acetonitril; Isokratischer Lauf mit 15 Teilen A zu 85 Teilen B bei 9 mL/min und einer Detektion bei 254 nm. Die verwendete Säule stammt von Macherey Nagel, mit der Bezeichnung VP 250/21 NUCLEODUR C18 μm . Beschrieben ist nur das Regioisomer, welches in den Publikationen Erwähnung findet. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM-d_2): 8.01 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, Phenyl-H), 7.60 (s, 1H, Vinyl-H), 7.52 – 7.51 (m, 1H, Phenyl-H), 7.47 (td, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz, 1H, Phenyl-H), 7.33 – 7.25 (m, 5H, Phenyl-H), 4.39 (d, $^2J = 13.4$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.92 (d, $^2J = 13.4$ Hz, $\alpha\text{-CH}_2$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DCM-d_2): 197.21, 138.20, 136.28, 135.50, 134.70, 134.39, 132.74, 131.30, 130.85, 130.60, 129.82, 129.16, 128.43, 127.98, 124.25, 49.58 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.³¹⁰

11-Brom-5,6-dihydrodibenzo[a,e][8]annulen-5-ol / 12-Brom-5,6-dihydrodibenzo[a,e][8]annulen-5-ol (rac-57a/rac-57b)



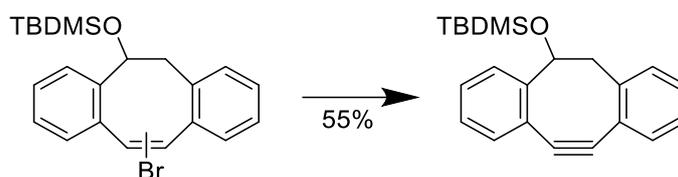
4.10 mL einer 1.2 M Lösung von Diisobutylaluminiumhydrid in Toluol (4.90 mmol, 1.2 eq.) wurden über 30 min bei -78 °C zu einer Lösung von 1.23 g der Ketone **56a** und **56b** (4.11 mmol, 1.0 eq.) in 23 mL trockenem Dichlormethan getropft. Nachdem 5 h konnte mittels DC vollständiger Umsatz des Edukts festgestellt werden. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur mit 23 mL gesättigter Ammoniumchloridlösung versetzt und 64 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel, der durch Filtration isoliert wurde. Jener Feststoff wurde in 25 mL 1 M Salzsäure gelöst und viermal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingedunstet. Der Rückstand wurde in 5 mL Dichlormethan aufgenommen. Die gesättigte Ammoniumchloridlösung wurde ebenfalls mit 1 M Salzsäure angesäuert und viermal mit je 25 mL Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase mit 10 mL Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mittels Säulenchromatografie (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) gereinigt. Die einzelnen Regioisomere konnten einzeln als weißer Feststoff (Isomer 1: 63%, 0.78 g, 2.59 mmol; Isomer 2: 25%, 0.31 g, 1.03 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.28$ (Isomer 1), 0.35 (Isomer 2) (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Isomer 1: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM-d_2): 7.45 (s, 1H, Vinyl-H), 7.36 – 7.34 (m, 1H, Ar-H), 7.33 – 7.28 (m, 1H, Ar-H), 7.23 – 7.15 (m, 5H, Ar-H), 7.09 – 7.08 (m, 1H, Ar-H), 5.12 (bs, 1H, H-5), 3.53 – 3.41 (m, 1H, H-6'/6''), 3.39 – 3.29 (m, 1H, H-6'/6''), 1.97 (d, $^3J = 4.4$ Hz, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DCM-d_2): 139.05, 137.07, 134.75, 134.34, 129.54, 128.53, 127.77, 127.09, 27.52 ppm. Isomer 2: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM-d_2): 7.58 – 7.38 (m, 2H, Ar-H), 7.36 – 7.25 (m, 2H, Ar-H), 7.21 (td, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.10 – 7.01 (m, 4H, Ar-H), 5.56 (bs, 1H, H-5), 3.63 (bs, 1H, H-6'/6''), 3.02 (bs, 1H, H-6'/6''), 2.19 (bs, 1H, OH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DCM-d_2): 137.03, 136.41, 129.85, 129.18, 128.13, 127.72, 126.35, 27.52 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den für Isomer 1 überein.³¹⁰ Die Schützung wurde nur mit Isomer 1 durchgeführt.

TBDMS-Ether von 57 (*rac*-58a/*rac*-58b)



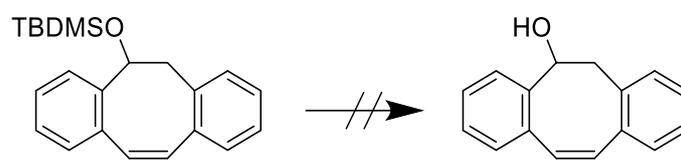
747 mg von Isomer 1 **rac**-57 (2.48 mmol, 1.0 eq.) wurden bei Raumtemperatur in 30 ml trockenem Dichlormethan gelöst und anschließend auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Innerhalb von 30 min wurde eine Lösung von 600 μl 2,6-Lutidin (5.17 mmol, 2.1 eq.) und 0.65 ml *tert*-Butyldimethylsilyltrifluormethansulfonat (2.83 mmol, 1.1 eq.) in 4.7 ml trockenem Dichlormethan zugetropft. Die Lösung wurde weitere 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 3.5 h gerührt. 25 ml Wasser wurden zugegeben, die Phasen in einem Scheidetrichter getrennt und die wässrige Phase viermal mit je 60 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferten das Rohprodukt als leicht gelbliches Öl. Das Rohprodukt wurde mit Cyclohexan durch Kieselgel filtriert und konnte mit quantitativem Umsatz isoliert werden. $R_f = 0.38$ (Cyclohexan). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM-d_2): 7.41 (s, 1H, Vinyl-H), 7.37 – 7.30 (m, 2H, Ar-H), 7.19 – 7.15 (m, 1H, Ar-H), 7.14 – 7.09 (m, 4H, Ar-H), 7.03 – 7.01 (m, 1H, Ar-H), 5.32 – 5.25 (m, 1H, H-5), 3.56 – 3.48 (m, 1H, H-6'/6''), 3.26 – 3.16 (m, 1H, H-6'/6''), 0.92 (s, 9H, $-\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.14 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$), 0.00 (s, 3H, $-\text{SiCH}_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DCM-d_2): 142.01, 139.00, 137.59, 135.14, 134.38, 131.51, 130.20, 129.79, 129.30, 128.41, 128.17, 127.06, 126.79, 123.49, 54.00, 45.11, 30.31, 26.21, 26.11, 18.65, -2.60, -4.29, -4.37 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.³¹⁰

11,12-Didehydro-5-[[*tert*-butyl]dimethylsilyloxy]-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*]cycloocten (*rac*-59)



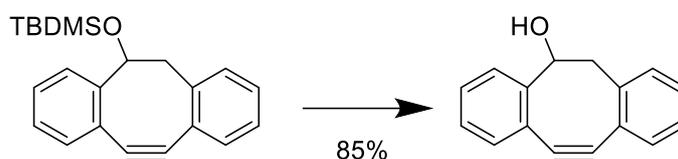
13 ml einer 1 M Lösung von Kalium-*tert*-Butanolat in Tetrahydrofuran (13.0 mmol, 5.2 eq.) und 2 ml trockenem Tetrahydrofuran wurden bei -78 °C vorgelegt. Das Alken **rac-58** (1.03 g, 2.48 mmol, 1.0 eq.) wurde mit 15 ml trockenem Tetrahydrofuran verdünnt und über 60 min zugetropft. Nach weiteren 15 min Rühren in der Kälte wurde die milchig trübe Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt, wobei eine zunehmende Grünfärbung beobachtet werden konnte. Nach weiteren zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der dunkelgrüne Rückstand wurde mit 50 ml gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung versetzt. Die bräunliche Suspension wurde mit 50 ml Dichlormethan versetzt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Cyclohexan/Dichlormethan 1:1). Das zunächst gelblich-ölige Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet und kristallisierte nach einem Tag im Kolben zu einem gelblichen Feststoff aus. Es konnten 457 mg (1.37 mmol, 55% der theoretischen Ausbeute) isoliert werden. $R_f = 0.75$ (Cyclohexan/Dichlormethan 1:1). Smp.: 40 °C (Lit.: 72 – 74 °C)³¹⁰
 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DCM-d_2): 7.77 – 7.76 (m, 1H, Ar-H), 7.41 – 7.28 (m, 7H, Ar-H), 4.56 (m, 1H, H-5), 3.12 (dd, $^2J = 14.7$ Hz, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, H-6), 2.90 (dd, $^2J = 14.7$ Hz $^3J = 3.7$ Hz, 1H, H-6), 0.96 (s, 9H, –SiC(CH₃)₃), -0.06 (s, 3H, –SiCH₃), -0.11 (s, 3H, –SiCH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DCM-d_2): 157.12, 152.52, 130.56, 128.50, 128.36, 127.38, 127.14, 126.56, 126.36, 125.49, 124.63, 121.56, 113.37, 111.24, 76.45, 54.00, 50.88, 26.27, 18.67, -4.30, -4.76 ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.³¹⁰

11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*]cycloocten-5-ol (*rac*-60)



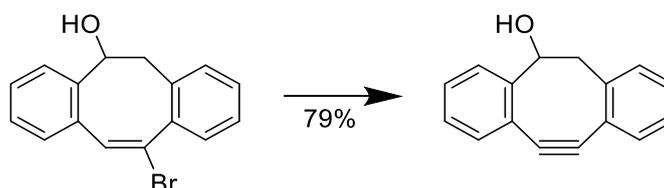
435 mg des geschützten Alkins **rac-59** (1.30 mmol, 1.0 eq.) wurden in 10.5 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 2.6 mL einer 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran (2.60 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und für 90 min gerührt. Anschließend wurde das Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 100 mL Dichlormethan/Wasser 1:1 aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Dichlormethan 1:1) gereinigt. Es konnte kein Produkt isoliert werden.

11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*]cycloocten-5-ol (*rac*-60)



350 mg des geschützten Alkins **rac-59** (1.05 mmol, 1.0 eq.) wurden in 11 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Bei Raumtemperatur wurden 662 mg Tetrabutylammoniumfluoridtrihydrat (2.10 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und für 90 min gerührt. Anschließend wurde das Tetrahydrofuran unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 100 mL Dichlormethan/Wasser 1:1 aufgenommen und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan) gereinigt und aus Cyclohexan umkristallisiert. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (85%, 197 mg, 0.89 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.30$ (Dichlormethan/Cyclohexan 2:1). Smp.: 144 °C (Lit: 135 – 136 °C)³¹⁰. ¹H-NMR (600 MHz, CD₃CN): 7.76 – 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.48 – 7.46 (m, 1H, Ar-H), 7.44 (td, ³*J* = 7.4 Hz, ⁴*J* = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.37 – 7.30 (m, 5H, Ar-H), 4.45 (m, 1H, H-5), 3.83 (d, ³*J* = 4.9 Hz, 1H, OH), 3.09 (dd, ²*J* = 14.6 Hz, ³*J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'/6''), 2.81 (dd, ²*J* = 14.6 Hz, ³*J* = 3.8 Hz, 1H, H-6'/6'') ppm. ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃CN): 157.63, 153.18, 130.75, 129.18, 129.14, 127.98, 127.69, 126.91, 126.85, 125.37, 124.80, 121.87, 113.44, 111.61, 75.33, 49.93 ppm. EA: errechnet für C₁₆H₁₂O C: 87.25, H: 5.49; gefunden C: 86.97, H: 5.63. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.^{278,310}

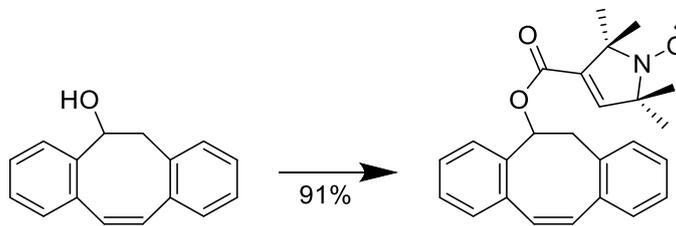
11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*]cycloocten-5-ol (*rac*-60)



Die Synthese orientiert sich an einer von Mbua, Guo *et al.* Publizierten Methode.²⁷⁸

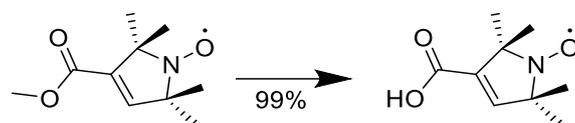
4.27 g des Isomerengemischs **rac-57** (14.18 mmol, 1.0 eq.) wurden in 330 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nun wurden 33.6 mL einer 2 M Lithiumdiisopropylamid in Tetrahydrofuran/Heptan/Ethylbenzol (67.2 mmol, 4.7 eq.) langsam über 30 min zugetropft und anschließend weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Zugabe von 100 mL Wasser gequenchet und die wässrige Phase dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Dichlormethan) gereinigt und aus Cyclohexan umkristallisiert. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (79%, 2.46 g, 11.17 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.30$ (Dichlormethan/Cyclohexan 2:1). Smp.: 144 °C (Lit: 135 – 136 °C)³¹⁰. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3CN): 7.76 – 7.73 (m, 1H, Ar-H), 7.48 – 7.46 (m, 1H, Ar-H), 7.44 (td, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.37 – 7.30 (m, 5H, Ar-H), 4.45 (m, 1H, H-5), 3.83 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 1H, OH), 3.09 (dd, $^2J = 14.6$ Hz, $^3J = 2.1$ Hz, 1H, H-6'/6''), 2.81 (dd, $^2J = 14.6$ Hz, $^3J = 3.8$ Hz, 1H, H-6'/6'') ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3CN): 157.63, 153.18, 130.75, 129.18, 129.14, 127.98, 127.69, 126.91, 126.85, 125.37, 124.80, 121.87, 113.44, 111.61, 75.33, 49.93 ppm. EA: errechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}$ C: 87.25, H: 5.49; gefunden C: 86.87, H: 5.59. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Publizierten überein.^{278,310}

3-(11,12-Didehydro-5,6-dihydrodibenzo[*a,e*]cycloocten-5-yl)-2,5-dihydro-2,2,5,5-tetramethyl-1-*H*-pyrrol-1-oxyl-3-carboxylat (**rac-62**)



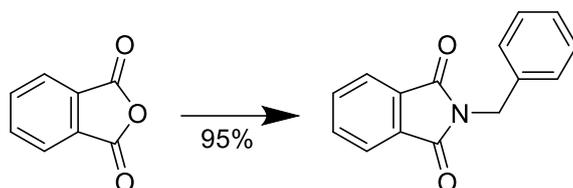
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (0.54 mmol, 1.2 eq.) sowie 84 mg 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-oxyl **61** (0.45 mmol, 1.0 eq.) und eine katalytische Menge 4-(Dimethylamino)pyridin wurden 6 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden 200 mg des Cyclooctins **rac-60** (0.91 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 20 mL Dichlormethan und 20 mL gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Der erhaltene gelbe Feststoff wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert und konnte als gelber, kristalliner Feststoff (91%, 160 mg, 0.41 mmol) erhalten werden. $R_f = 0.77$ (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1). Smp.: 171 – 172 °C. EA: errechnet für $C_{25}H_{24}NO_3$ C:77.70, H: 6.26, N: 3.62; gefunden C: 77.71, H: 6.25, N: 3.56.

3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-oxyl (61)



Der Carbonsäureester (1.00 g, 5.04 mmol, 1.0 eq.) wurde in 20 mL Tetrahydrofuran/Wasser 1:1 gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde das Lithiumhydroxid (242 mg, 10.09 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 120 min bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie kein Edukt mehr festgestellt werden konnte, wurde die Reaktionslösung mit 1 M Salzsäure angesäuert und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe Feststoff wurde aus Toluol umkristallisiert. Smp.: 211 °C (Lit.: 210 – 211 °C)³¹²

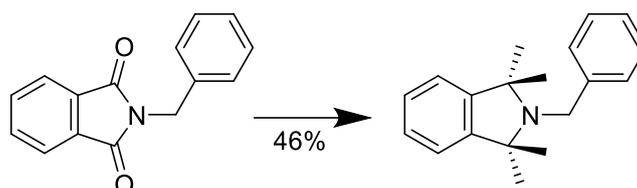
2-Benzylisindolin-1,3-dion (97)



Die Synthese orientiert sich an einer von Wu *et al.* publizierten Methode.³¹³

Zu 155 mL Eisessig wurde bei Raumtemperatur Benzylamin (40.5 mL, 0.37 mmol, 1.1 eq.) zugetropft. Danach wurde auf einmal Phthalsäureanhydrid (**96**) (50.0 g, 0.34 mmol, 1.0 eq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 120 min auf 125 °C erhitzt, um sie danach auf 0 °C abzukühlen. Der Feststoff wurde filtriert und mit 400 mL Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt in Form farbloser Nadeln (95%, 74.9 g, 0.32 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.56$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Smp.: 118 °C (Lit.: 118 °C)³¹⁴. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.81 – 7.76 (m, 2H, Aryl-H), 7.66 – 7.62 (m, 2H, Aryl-H), 7.40 – 7.38 (m, 2H, *meta*-Phenyl-H), 7.29 – 7.21 (m, 3H, *ortho*-, *para*-Phenyl-H), 4.80 (s, 2H, -CH₂-Phenyl) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 168.12, 136.49, 134.06, 132.24, 128.77, 128.71, 127.92, 123.43, 41.71 ppm. MS (ESI): m/z: 141.11 [M + 2Na⁺]. HRMS: errechnet für C₁₅H₁₁NO₂Na [M + Na⁺]: 260.06820; 260.06820 gefunden.

2-Benzyl-1,1,3,3-tetramethylisoindolin (98)

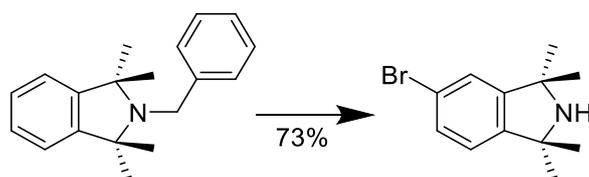


Die Synthese orientiert sich an einer von Haugland *et al.* publizierten Methode.³¹⁵

Das Magnesium (24.5 g, 1.01 mol, 16.0 eq.) zur Darstellung des Grignardreagenzes wurde vorgelegt und bei 250 °C im Vakuum für 15 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Granulat mit 100 mL trockenem Diethylether überschichtet und langsam eine Lösung aus Iodmethan (47.0 mL, 0.76 mol, 12.0 eq.) in 50 mL trockenem Diethylether langsam zutropft. Während des Zutropfens trübte sich der Diethylether zunehmend und fing an zu sieden, wobei die Zutropfgeschwindigkeit der Iodmethanlösung so eingestellt wurde, dass die Reaktionslösung leicht siedete. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch noch 95 min zum Sieden erhitzt und mit Hilfe einer Dean-Stark Apparatur 100 mL Diethylether destillativ entfernt und durch die gleiche Menge an trockenem Toluol ersetzt. Nun wurde erneut so viel Lösungsmittel entfernt bis die Temperatur der Gasphase der Siedetemperatur von Toluol entsprach und das entnommene Volumen mit trockenem Toluol aufgefüllt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Benzylisoindolin-1,3-dion (**97**) (15.0 g, 63.0 mmol, 1.0 eq.) gelöst in 100 mL heißem, trockenem Toluol auf einmal zugegeben. Hierbei wurde ein steter Strom an Inertgas durch die Apparatur geleitet, da es sonst zu starker Schaumbildung kommt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h zum Sieden erhitzt, die Hälfte des Toluols destillativ entfernt und nach dem Abkühlen mit 200 mL *n*-Hexan aufgefüllt. Das Gemisch wurde weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurden bei 0 °C 120 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zutropft und weiter gerührt, bis sich das verbleibende Magnesium auflöste. Sobald die Reaktionslösung mit Sauerstoff in Kontakt kommt, verfärbt sie sich violett. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase siebenmal mit je 150 mL Cyclohexan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan + 1% Triethylamin) gereinigt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (46%, 7.6 g, 29.0 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.51$ (Cyclohexan + 1% Triethylamin). Smp.: 63 °C (Lit.: 63 – 64 °C)^{316,317}. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.55 – 7.53 (m, 2H, Aryl-H), 7.37 – 7.34 (m, 2H, Aryl-H), 7.32 – 7.27 (m, 3H, Aryl-H), 7.22 – 7.19 (m, 2H, Aryl-H), 4.07 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Phenyl}$), 1.38 (s, 12H, Pyrrolidin- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 148.01, 143.59, 128.47,

128.06, 126.92, 126.56, 121.46, 65.34, 46.40, 28.56 ppm. MS (ESI): m/z : 266.18 $[M + H^+]$. HRMS: errechnet für $C_{19}H_{24}N$ $[M + H^+]$: 266.19033; 266.19139 gefunden.

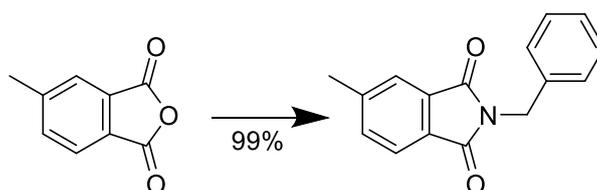
5-Brom-1,1,3,3-tetramethyloindolin (99)



Die Synthese orientiert sich an einer von Debele E. A. beschriebenen Methode.²⁹⁰

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 2-Benzyl-1,1,3,3-tetramethylisindolin (**98**) (2.0 g, 7.54 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL trockenem Dichlormethan wurde langsam Brom (0.85 mL, 16.58 mmol, 2.2 eq.) zugetropft. Es wurde darauf geachtet, dass die Kolbeninnentemperatur bei 0 – 4 °C lag. Unmittelbar nach dem Brom wurde trockenes und gemörseretes Aluminiumtrichlorid (3.50 g, 26.38 mmol, 3.5 eq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 60 min bei 0 °C gerührt. Die Mischung wurde anschließend auf 100 g Eis gegossen und nach 15 min mit 10 M Natriumhydroxidlösung stark alkalisiert. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde nun mit 60 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 20 mL Methanol aufgenommen, mit 100 mg Natriumhydrogencarbonat versetzt und unter Rühren so lange 30%ige Wasserstoffperoxidlösung zugetropft, bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet werden konnte. Anschließend wurden 40 mL einer 2 M Schwefelsäure zugegeben und die Lösung zweimal mit je 50 mL Dichlormethan gewaschen. Die organische Phase wurde noch zweimal mit je 40 mL 2 M Schwefelsäure extrahiert und die vereinte wässrige Phase mit 10 M Natriumhydroxidlösung bei 0 °C erneut stark alkalisiert, woraufhin die wässrige Phase dreimal mit je 70 mL Dichlormethan extrahiert wurde. Die vereinte organische Phase wurde zweimal mit je 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) gereinigt. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff (73%, 1.40 g, 5.52 mmol) erhalten. $R_f = 0.50$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1). Smp.: 57 – 58 °C (Lit.: 58 – 60 °C)²⁹⁰. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.25 (dd, $^3J = 8.1$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.14 (d, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, Aryl-H), 6.89 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1H, Aryl-H), 1.84 (bs, 1H, -NH), 1.35 – 1.33 (m, 12H, Pyrrolidin- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): 151.23, 150.21, 147.86, 130.17, 126.81, 124.81, 123.13, 120.76, 62.70, 62.65, 31.83, 31.72 ppm. MS (ESI): m/z: 254.03 [M + H⁺]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BrN}$ [M + H⁺]: 254.05389; 254.05444 gefunden.

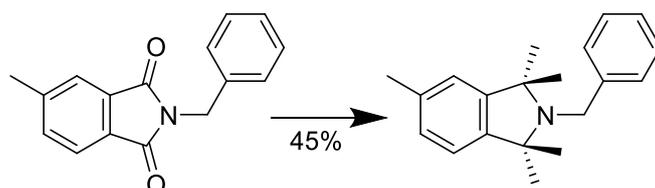
2-Benzyl-5-methylisoindolin-1,3-dion (64)



Die Synthese orientiert sich an einer von Wu *et al.* publizierten Methode.³¹³

4-Methylphthalsäureanhydrid (**63**) (75.0 g, 462 mmol, 1.0 eq.) wurde in einem Kolben in Benzylamin (56.0 mL, 508 mmol, 1.1 eq.) und 240 ml Eisessig gelöst und für 120 min bei 125 °C zum Sieden erhitzt. Danach wurde die Lösung für eine Stunde in einem Eisbad stehen gelassen. Der ausgefallene farblose Rückstand wurde filtriert, mehrmals mit Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als farbloses Pulver (99%, 115.2 g, 457 mmol) isoliert. $R_f = 0.57$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Smp.: 127 °C (Lit.: 128 – 130 °C)³¹⁸. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 7.72 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.64 (s, 1H, Aryl-H), 7.49 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.42 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.31 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, Aryl-H), 7.27 – 7.25 (m, 1H, Aryl-H), 4.83 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Phenyl}$), 2.50 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Aryl}$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): 168.40, 145.41, 136.68, 134.64, 132.72, 129.72, 128.80, 128.71, 127.90, 124.05, 123.41, 64.60, 41.71, 25.53, 22.13 ppm. MS (ESI): gefunden m/z : 252.10 $[\text{M} + \text{H}^+]$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_2$: 252.10.

2-Benzyl-1,1,3,3,5-pentamethylisoindolin (65)

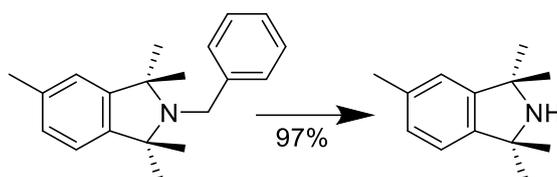


Die Synthese orientiert sich an einer von Haugland *et al.* publizierten Methode.³¹⁵

Das Magnesium (11.6 g, 0.48 mol, 8.0 eq.) zur Darstellung des Grignardreagenzes wurde vorgelegt und bei 250 °C für 15 min im Vakuum erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Granulat mit 100 mL trockenem Diethylether überschichtet und langsam eine Lösung aus Iodmethan (22.3 mL, 0.36 mol, 6.0 eq.) in 50 mL trockenem Diethylether langsam zutropft. Während des Zutropfens trübte sich der Diethylether zunehmend und fing an zu sieden, wobei die Zutropfgeschwindigkeit der Iodmethanlösung so eingestellt wurde, dass die Reaktionslösung leicht siedete. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch noch 95 min zum Sieden erhitzt und mit Hilfe einer Dean-Stark Apparatur 100 mL Diethylether destillativ entfernt und durch die gleiche Menge an trockenem Toluol ersetzt. Nun wurde erneut so viel Lösungsmittel entfernt bis die Temperatur der Gasphase der Siedetemperatur von Toluol entsprach und das entnommene Volumen mit trockenem Toluol aufgefüllt. Anschließend wurde eine Lösung aus 2-Benzyl-5-methylisoindolin-1,3-dion (**64**) (15.0 g, 59.7 mmol, 1.0 eq.) gelöst in 100 mL heißem, trockenem Toluol auf einmal zugegeben. Hierbei wurde ein steter Strom an Inertgas durch die Apparatur geleitet, da es sonst zu starker Schaumbildung kommt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h zum Sieden erhitzt, die Hälfte des Toluols destillativ entfernt und nach dem Abkühlen mit 200 mL *n*-Hexan aufgefüllt. Das Gemisch wurde weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurden bei 0 °C 120 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung zutropft und weiter gerührt, bis sich das verbleibende Magnesium auflöste. Sobald die Reaktionslösung mit Sauerstoff in Kontakt kommt, verfärbt sie sich violett. Anschließend wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase siebenmal mit je 150 mL Cyclohexan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan) gereinigt. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (45%, 7.57 g, 27.1 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.33$ (Cyclohexan). Smp.: 43 – 45 °C (Lit.: 51 °C)³¹⁹. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.47 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Aryl-H), 7.29 (t, ³J = 7.3 Hz, 2H, Aryl-H), 7.22 – 7.18 (m, 1H, Aryl-H), 7.07 – 7.02 (m, 2H, Aryl-H), 6.99 (s, 1H, Aryl-H), 4.00 (s, 2H, -CH₂-Phenyl), 2.32 (s, 3H, CH₃-Aryl), 1.28 – 1.27 (m, 12H, Pyrrolidon-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 148.18, 145.30, 143.69, 136.52, 128.98, 128.49, 128.04, 127.80, 126.53, 122.08, 121.24, 65.25, 65.10, 64.60,

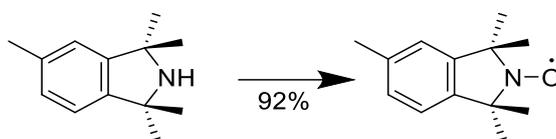
46.43, 28.62, 28.54, 25.53, 21.54 ppm. MS (ESI): gefunden m/z: 280.20 [M + H⁺], berechnet für C₂₀H₂₆N:
280.20.

1,1,3,3,5-Pentamethylisindolin (66)



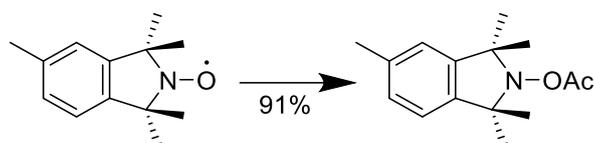
2-Benzyl-1,1,3,3,5-pentamethylisindolin (**65**) (6.00 g, 21.5 mmol, 1.0 eq.) wurde als feines Pulver mit 5 Gew% Palladium auf Aktivkohle (340 mg) vorgelegt und in 250 ml trockenem Methanol gelöst. Der Kolben wurde mehrmals mit Argon gespült. Danach wurde mittels Ballons die Schutzgasatmosphäre gegen eine Wasserstoffatmosphäre ausgetauscht. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für zwei Tage gerührt. Die Lösung wurde über Celite® filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das gelb-flüssige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 + 1% Triethylamin) gereinigt. Das Produkt wurde als leicht gelblicher Feststoff (97%, 3.99 g, 20.9 mmol) isoliert. $R_f = 0.54$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): 7.07 (dd, $^3J = 7.1$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.02 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, Aryl-H), 6.93 (s, 1H, Aryl-H), 2.37 (s, 3H, CH_3 -Aryl), 1.45 – 1.44 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): 149.15, 146.18, 136.91, 128.14, 122.16, 121.33, 62.77, 62.65, 32.16, 32.08, 21.44 ppm. MS (ESI): gefunden m/z: 190.15 [$\text{M} + \text{H}^+$], berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}$: 190.16.

1,1,3,3,5-Pentamethylisindolin-2-yloxyl (67)



Zu einer Lösung aus 1,1,3,3,5-Pentamethylisindolin (**66**) (6.43 g, 34.00 mmol, 1.0 eq.) in trockenem 170 mL Dichlormethan wurde bei einer Temperatur von 0 °C *meta*-Chlorperbenzoesäure (15.0 g, 66.98 mmol, 2.0 eq., 77% Reinheit) portionsweise hinzugegeben. Die Lösung wurde 60 min bei 0 °C und weitere 120 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden 50 mL 2 M Kaliumhydroxidlösung hinzugegeben, bis sich der ausgefallene Feststoff löste. Die organische und wässrige Phase wurde getrennt, die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinte organische Phase mit 300 mL Wasser und 200 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1) gereinigt. Das Produkt wurde als gelber Feststoff (92%, 6.29 g, 30.79 mmol) isoliert. $R_f = 0.60$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). Smp.: 89 – 91 °C (Lit.: 90 °C)³¹⁹. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): 6.97 – 6.91 (m, 3H, Aryl-H), 2.26 (s, 3H, CH_3 -Aryl), 1.37 – 1.32 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. EA: errechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$ C: 76.43, H: 8.88, N: 7.83; gefunden C: 76.51, H: 8.90, N: 7.64.

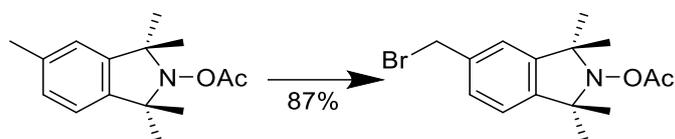
2-Acetoxy-1,1,3,3,5-pentamethylisoindolin (68)



Die Synthese orientiert sich an einer von Thomas *et al.* publizierten Methode.³¹⁹

1,1,3,3,5-Pentamethylisoindolin-2-yl (67) (3.20 g, 15.7 mmol, 1.0 eq.) und 10 Gew% Palladium auf Aktivkohle (320 mg) wurden vorgelegt. Nachdem der Kolben mehrmals evakuiert und anschließend mit Argon befüllt wurde, wurden 80 mL trockenes Tetrahydrofuran hinzugegeben. Über Ballons, gefüllt mit Wasserstoff, wurde im Kolben die Gasatmosphäre ausgetauscht und die Lösung daraufhin für 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Gasatmosphäre des Kolbens gegen Argon ausgetauscht. Zu der nun auf 0 °C gekühlten Lösung wurden Triethylamin (5.46 mL, 39.2 mmol, 2.5 eq.) und Acetylchlorid (2.24 mL, 31.3 mmol, 2.0 eq.) hinzugegeben, 30 min bei 0 °C und danach einen Tag lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite® filtriert, die flüchtigen Bestandteile des Filtrats entfernt und der resultierende Rückstand in 80 mL Ethylacetat gelöst. Die Lösung wurde mit 100 mL Wasser und 100 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und die flüchtigen Bestandteile entfernt. Das erhaltene gelb-feste Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) gereinigt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (91%, 3.53 g, 14.3 mmol) erhalten. $R_f = 0.38$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1). Smp.: 112 – 114 °C (Lit.: 113 °C)³¹⁹. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): 7.08 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.01 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H, Aryl-H), 6.93 (s, 1H, Aryl-H), 2.36 (s, 3H, CH_3 -Aryl), 2.20 (s, 3H, -OAc), 1.43 (s, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): 171.98, 144.13, 141.24, 137.52, 128.65, 122.23, 121.49, 68.33, 68.21, 64.58, 29.16, 27.08, 25.52, 21.60, 19.41 ppm. MS (ESI) gefunden m/z: 270.20 [$\text{M} + \text{Na}^+$], berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{Na}$: 270.14.

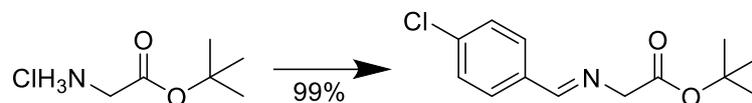
2-Acetoxy-5-bromomethyl-1,1,3,3-tetramethylisoindolin (69)



Die Synthese orientiert sich an einer von Komes, Tran *et al.* publizierten Methode.³²⁰

Eine Suspension bestehend aus 2-Acetoxy-1,1,3,3,5-pentamethylisoindolin (**68**) (200.0 mg, 0.81 mmol, 1.0 eq.), *N*-Bromsuccinimid (316.6 mg, 1.78 mmol, 2.2 eq.) und Dibenzoylperoxid (3.92 mg, 16.17 μ mol, 0.02 eq.) in 7 mL trockenem Tetrachlorkohlenstoff wurde für vier Stunden mit einer Weißlichtlampe bestrahlt. Anschließend wurde die Lösung nacheinander mit je 15 mL gesättigter Natriumcarbonat-, Natriumthiosulfat- und Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde aus *n*-Hexan umkristallisiert. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff (87%, 229.9 mg, 0.71 mmol) isoliert. $R_f = 0.64$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). Smp.: 121 – 128 °C. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.31 (dd, ³*J* = 7.3 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, 1H, Aryl-H), 7.14 (d, ³*J* = 7.1 Hz, 1H, Aryl-H), 7.09 (d, ³*J* = 7.10 Hz, 1H, Aryl-H), 4.51 (s, 2H, Br-CH₂-Aryl), 2.20 (s, 3H, -OAc), 1.44 – 1.39 (m, 12H, Pyrrol-CH₃) ppm. ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): 211.68, 144.85, 144.56, 137.52, 128.83, 122.42, 122.20, 68.32, 68.28, 33.73, 19.37 ppm. MS (ESI): gefunden *m/z*: 326.07 [M + H⁺], berechnet für C₁₅H₂₁BrNO₂: 326.07.

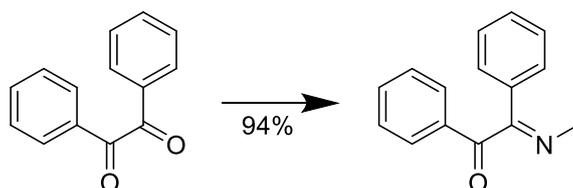
(E)-2-([4-Chlorbenzyliden]amino)essigsäure-*tert*-butylester (72)



Die Synthese orientiert sich an einer von Lasch *et al.* publizierten Methode.³²¹

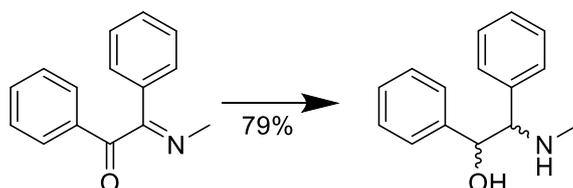
Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus 4-Chlorbenzaldehyd (**71**) (1.40 g, 9.94 mmol, 1.0 eq.), Natriumsulfat (1.70 g, 12.0 mmol, 1.2 eq.) und Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid (**70**) (2.00 g, 11.93 mmol, 1.2 eq.) in 25 mL trockenem Dichlormethan wurde Triethylamin (1.7 mL, 12.2 mmol, 1.2 eq.) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurden 25 mL Diethylether zugegeben und filtriert. Das Filtrat wurde dreimal mit je 25 mL Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (99%, 2.50 g, 9.85 mmol) isoliert. $R_f = 0.52$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): 8.23 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$), 7.74 – 7.70 (m, 2H, Aryl-H), 7.41 – 7.38 (m, 2H, Aryl-H), 4.30 (d, $^2J = 4.3$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 1.50 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): 169.35, 163.90, 137.28, 134.42, 129.79, 129.04, 81.74, 62.71, 28.27 ppm. MS (ESI): gefunden 254.10 $[\text{M} + \text{H}^+]$, berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{ClNO}_2$: 254.09.

(E)-2-(methylimino)-1,2-diphenylethan-1-on (80)



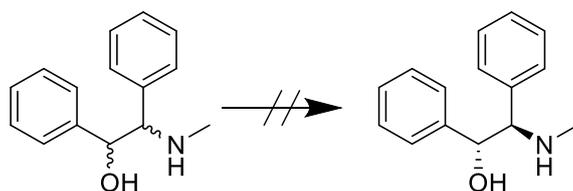
Zu einer Lösung aus Benzil (**79**) (20.0 g, 95.13 mmol, 1.0 eq.) in 100 mL Methanol wurde Methylamin (24.7 mL, 285.40 mmol, 3.0 eq., 40 Gew% in Wasser) zugegeben und auf 50 °C erhitzt, bis sich der entstehende Feststoff auflöste. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt woraufhin ein Feststoff ausfiel, welche filtriert und zweimal mit je 100 mL Wasser gewaschen wurde. Erneut ausfallender Feststoff im Filtrat wurde analog behandelt. Der Rückstand wurde getrocknet und aus Methanol umkristallisiert. Das Produkt konnte als weißer Feststoff (94%, 20.5 g, 89.4 mmol) isoliert werden. Smp.: 87 °C (Lit.: 87-89 °C)²⁸⁵. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 7.92 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H, Aryl-H), 7.69 (d ³J = 8.4 Hz, 2H, Aryl-H), 7.63 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, Aryl-H), 7.50 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, Aryl-H), 7.42 (t, ³J = 7.2 Hz, 1H, Aryl-H), 7.37 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, Aryl-H), 3.36 (s, 3H, -NCH₃) ppm. ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): 199.16, 168.36, 135.47, 134.85, 134.80, 130.98, 129.47, 129.33, 128.82, 127.3ß, 41.22 ppm. MS (ESI): gefunden: 224.00 [M + H⁺], berechnet für C₁₅H₁₄NO: 224.09.

(±)-Pseudoephedrin (81)



Zu einer auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung aus (E)-2-(methylimino)-1,2-diphenylethan-1-on (**80**) (5.00 g, 22.0 mmol, 1.0 eq.) in 60 ml trockenem Tetrahydrofuran wurden über einen Zeitraum von 50 min langsam Lithiumaluminiumhydrid (1.95 g, 49.0 mmol, 2.2 eq.) zugegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur nicht über $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ stieg. Anschließend rührte die Reaktionslösung weitere 60 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurden vorsichtig 9 ml Wasser und 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung zugegeben. Die Reaktion wurde nun auf Raumtemperatur erwärmt und die entstandenen Salze filtriert. Das Filtrat wurde viermal mit je 10 ml Diethylether extrahiert und die vereinte organische Phase mit je 5 ml Wasser und 5 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde als hellgelber Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , 4.5:1 dr): 7.27 – 7.15 (m, 9H, Aryl-H), 7.10 – 7.08 (m, 2H, Aryl-H), 7.05 – 7.03 (m, 2H, Aryl-H), 4.85 (d, $^3J = 5.9\text{ Hz}$, 0.2H, -CH-OH), 4.61 (d, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, -CH-OH), 3.78 (d, $^3J = 5.9\text{ Hz}$, 0.2H, -CH-NCH₃), 3.53 (d, $^3J = 8.5\text{ Hz}$, 1H, -CH-NCH₃), 2.32 (s, 3H, -NCH₃), 2.29 (s, 0.6H, -NCH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): 141.38, 140.78, 139.30, 139.02, 128.49, 128.45, 128.33, 128.18, 128.05, 128.04, 127.78, 127.77, 127.69, 127.57, 126.99, 126.96, 77.64, 77.16, 76.57, 72.43, 71.17, 34.38, 34.16 ppm. MS (ESI): gefunden: 228.03 [M + H⁺], berechnet für C₁₅H₁₈NO: 228.13.

(+)-Pseudoephedrin (83)

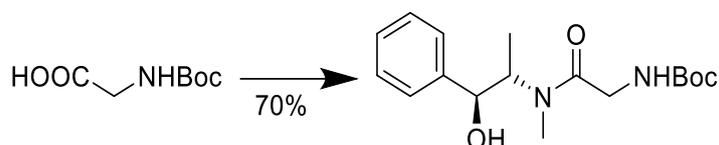


Die Synthese orientiert sich an einer von Mellem und Myers etablierten Methode.²⁸⁵

8.00 g (35.2 mmol, 1.0 eq.) des Isomerengemischs **81** wurde in 16 mL Methanol gegeben und bei 50 °C gerührt, bis eine klare Lösung entstand. Daraufhin wurde die Reaktionslösung nach Zugabe der Mandelsäure auf Raumtemperatur abgekühlt, der Kolbenboden mit einem Spatel angekratzt und bei –20 °C für acht Tage gelagert. Da auch nach dieser Zeitspanne kein Niederschlag auftrat wurden der Lösung 80 mL Diethylether zugegeben und über Nacht bei 4 °C gelagert. Der Niederschlag wurde filtriert und im Vakuum getrocknet.

Die spektroskopischen Daten weisen jedoch daraufhin, dass anders als bei Mellem und Meyers kein Diastereomerenverhältnis von >19:1 dr aufzufinden war, sondern 1:1 dr. Auf ein Entfernen der Mandelsäure wurde deswegen verzichtet. Für weitere Zusammensetzungen hinsichtlich des Lösungsmittelgemisches sei auf Abschnitt 3.2.3 verwiesen. Es sei jedoch erwähnt, dass keiner der Kristallisationsansätze das gewünschte Ergebnis liefern konnte.

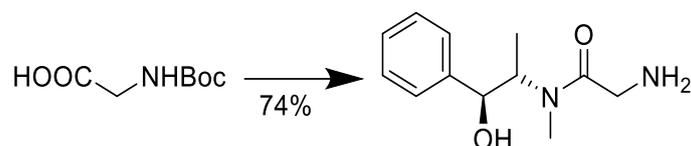
(S,S)-(+)-N-Boc-Pseudoephedrin-Glycinamid (89)



Die Synthese orientiert sich an einer von Myers *et al.* publizierten Methode.²⁸⁷

Boc-geschütztes Glycin (**84**) (1.00 g, 5.7 mmol, 1.3 eq.) und Triethylamin (0.67 ml, 4.8 mmol, 1.1 eq.) wurden in 20 mL trockenem Dichlormethan gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Pivaloylchlorid (0.76 ml, 5.7 mmol, 1.3 eq.) wurde langsam bei 0 °C zugetropft und anschließend für weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Triethylamin (0.67 ml, 4.8 mmol, 1.1 eq.) wurde erneut zugetropft und anschließend (S,S)-(+)-Pseudoephedrin (0.73 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) bei 0 °C portionsweise zugegeben und für eine Stunde gerührt. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurden 20 mL 1 M Salzsäure langsam zugetropft. Anschließend wurde 14 mL gesättigte Natriumchloridlösung ergänzt und die wässrige Phase zweimal mit je 14 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2) aufgetrennt. Das Produkt wurde in Form eines farblosen, schaumartigen Feststoffes (70%, 0.99 g, 3.1 mmol) erhalten. $R_f = 0.13$ (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2). $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , 1:1 Rotamere): 7.36 – 7.30 (m, 5H, Phenyl-H), 5.61 (m, 1H), 4.64 – 4.53 (m, 1.5H), 4.12 (dd, $^2J = 12.5$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 0.5H), 3.95 – 3.90 (m, 0.5H), 2.97 (s, 1.5H), 2.82 (s, 1.5H), 1.46 (s, 9H), 1.09 (d, $^3J = 6.5$ Hz, 1.5H), 0.98 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 1.5H) ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁷

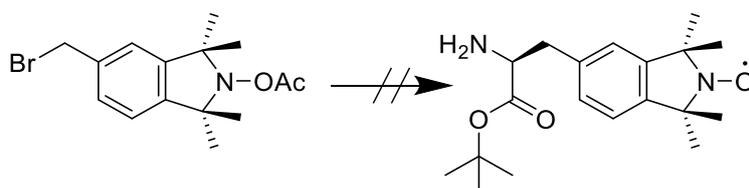
(S,S)-(+)-Pseudoephedrin-Glycinamid (90)



Die Synthese orientiert sich an einer von Myers *et al.* publizierten Methode.²⁸⁷

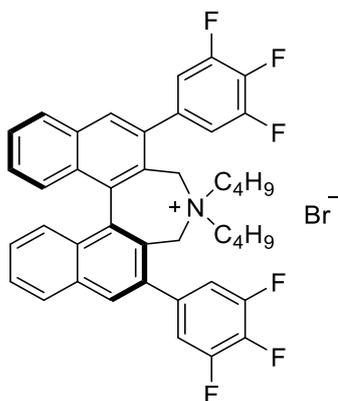
Boc-geschütztes Glycin (**84**) (1.0 g, 5.7 mmol, 1.3 eq.) wurde in 25 mL trockenem Dichlormethan gelöst und anschließend Triethylamin (0.67 ml, 4.8 mmol, 1.1 eq.) zugegeben. Pivaloylchlorid (0.76 ml, 5.7 mmol, 1.3 eq.) wurde bei 0 °C hinzuge tropft und anschließend für 50 Minuten bei 0 °C gerührt. Es wurde erneut Triethylamin (0.67 ml, 4.8 mmol, 1.1 eq.) hinzugeben. (S,S)-(+)-Pseudoephedrin wurde (0.73 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.) portionsweise bei 0 °C ergänzt. Die Reaktionslösung wurde 50 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene weiße Feststoff wurde in 24 mL einer 1:1 Mischung aus Methanol/Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend 7.3 mL konzentrierte Salzsäure tropfenweise zugegeben. Es wurde weitere drei Stunden bei 0 °C gerührt. Danach wurde das in der Lösung enthaltene Methanol im Vakuum entfernt und 50%ige Natriumhydroxidlösung bei 0 °C hinzugegeben, bis ein pH-Wert von 14 erreicht wurde. Der wässrige Teil wurde anschließend viermal mit je 13 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Kaliumcarbonat getrocknet. Der Rückstand wurde filtriert und die überstehende Lösung, nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck, in 8 mL Toluol gelöst. Das Toluol wurde im Vakuum entfernt und eine gelbe, viskose Lösung erhalten. Es wurde erneut 4 mL Toluol zugegeben und die erhaltene Lösung mit Pseudoephedrin-Glycinamid **90** angeimpft. Die Produktmischung wurde über Nacht bei 0 °C gelagert und anschließend in Form von farblosen Kristallen erhalten (74%, 0.72 g, 3.2 mmol). $R_f = 0.61$ (Dichlormethan/Methanol 9:1). Smp.: 65 – 75 °C (Lit.: 78 – 80 °C)²⁸⁷. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, 1:1 Rotamere): 7.36 – 7.28 (m, 5H, Phenyl-H), 4.64 – 4.50 (m, 1.5H), 3.96 – 3.81 (m, 0.5H), 3.72 (d, ²J = 15.6 Hz, 0.5H), 3.48 (d, ³J = 7.0 Hz, 1H), 3.37 (d, ²J = 17.1 Hz, 0.5H), 2.96 (s, 1.5H), 2.79 (s, 1.5H), 1.86 (bs, 3H), 1.08 (d, ³J = 6.5 Hz, 1.5H), 0.99 (d, ³J = 6.7 Hz, 1.5H) ppm. Die spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur überein.²⁸⁷ MS (ESI): gefunden: 222.99 [M + H⁺], berechnet für C₁₂H₁₈N₂O₂: 222.28.

Phasentransferkatalyse nach Maruoka zur Darstellung eines Phenylalaninderivats (74)



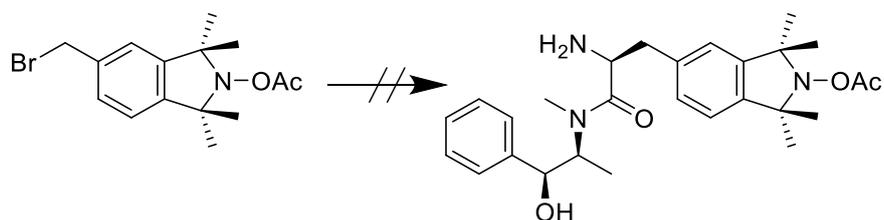
Die Synthese orientiert sich nach einer von Ooi, Arimura *et al.* publizierten Methode.³²²

Das O'Donnell Imin **72** (50.0 mg, 197.1 μmol , 1.0 eq.), das bromierte Isoindolin **69** (64.3 mg, 197.1 μmol , 1.0 eq.) und der Maruoka Phasentransferkatalysator (1.48 mg, 1.97 μmol , 0.01 eq.) wurden zusammen mit 1.5 mL trockenem Toluol in einem Schlenkrohr vorgelegt. Das Lösungsmittel wurde dreimal entgast, wobei das Schlenkrohr zunächst kurz evakuiert wird, um es danach wieder mit Argon zu befüllen. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und anschließend 0.5 mL einer wässrigen 50%igen Kaliumhydroxidlösung zugegeben. Für zwei Stunden wurde das Zweiphasengemisch bei 0 °C kräftig gerührt. Nach dem Hinzugeben von 10 mL destilliertem Wasser wurde die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Diethylether extrahiert und die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 mL Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und 10 mL einer 1 M Salzsäure zugegeben. Nach 30 min bei 0 °C wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und die wässrige Phase dreimal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Die vereinte organische Phase wurde zweimal mit je 10 mL 1 M Salzsäure extrahiert und verworfen. Die saure, wässrige Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf einen pH-Wert von acht eingestellt. Die wässrige Phase wurde daraufhin zweimal mit je 20 mL Ethylacetat extrahiert und die vereinte organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3). Es konnte kein Produkt isoliert werden.



eingesetzter Phasentransferkatalysator

Alkylierung von Pseudoephedrin–Glycinamid nach Myers zur Darstellung eines Phenylalaninderivats (93)



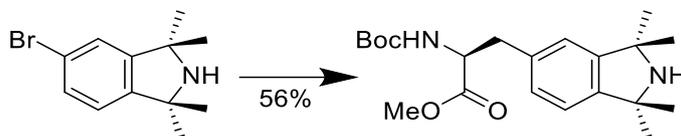
Die Synthese orientiert sich an einer von Myers, Gleason *et al.* publizierten Methode.²⁸⁷

Sofern die Lithiumdiisopropylamidlösung käuflich erworben wurde, so wurde diese zusammen mit Lithiumchlorid (6.0 eq.) vorgelegt (siehe Abschnitt 3.2.3 für die unterschiedlichen Stoffmengen), auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und das (*S,S*)-(+)-Pseudoephedrin–Glycinamid (**90**) (1.0 eq.) gelöst in 1 mL trockenem Tetrahydrofuran zugetropft und 20 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, 20 min bei dieser Temperatur gerührt und Alkylbromid **69** (1.2 eq.) zugegeben. Danach wurden weiter 60 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur. Durch die Zugabe von 7 mL 1 M Salzsäure wurde die Reaktion beendet und die wässrige Phase zweimal mit je 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde mit 10 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 9:1).

Wurde die Lithiumdiisopropylamidlösung händisch hergestellt, so wurden zunächst Diisopropylamin und Lithiumchlorid in Tetrahydrofuran gelöst und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Anschließend wurde 2.5 M *n*-Butyllithium in Hexan im Verhältnis 0.97 zugetropft und für 15 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Es wurde analog weiterverfahren.

Alternativ zu Lithiumdiisopropylamid wurde als Base auch Lithiumhexamethyldisilazid getestet. Hierbei wurde nach einer Vorschrift aus der Dissertation von Verena Ludwig gearbeitet.³²³ Eine Suspension aus Lithiumchlorid (6.00 eq) in Tetrahydrofuran wurde für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde (*S,S*)-(+)-Pseudoephedrin–Glycinamid (**90**) (1.0 eq.) über einen Zeitraum von 10 min portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und langsam Lithiumhexamethyldisilazid (1.5 eq.) zugetropft. Anschließend wurde restliche Lithiumhexamethyldisilazidlösung (1.7 eq.) bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einmal zugegeben. Es wurden weitere 30 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Zuletzt wurde das Isoindolin Derivat **69** (1.1 eq.) portionsweise zugegeben und weitere 60 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt analog wie oben beschrieben.

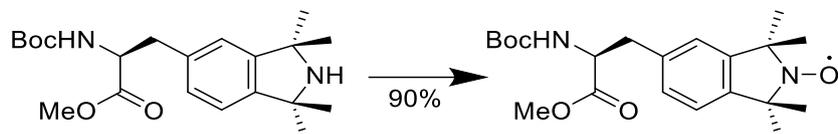
(S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-(1,1,3,3-tetramethylisoindolin-5-yl)propansäuremethylester
(101)



Die Synthese orientiert sich an Arbeiten von Jackson, Wishart *et al.*³²⁴ und Ross, Lang *et al.*³²⁵.

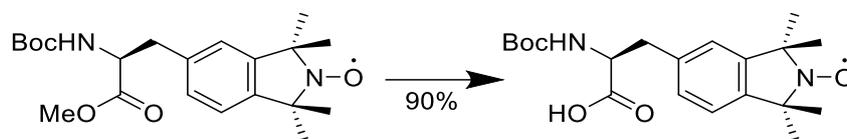
Zinkstaub (596.0 mg, 9.11 mmol, 6.0 eq.) wurde zunächst in einem trockenen Zweihalskolben vorgelegt und im Vakuum bei 400 °C für 20 min ausgeheizt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3 mL trockenes Dimethylformamid sowie eine katalytische Spatelspitze Iod zugegeben. Hierbei wurde eine Farbumschlag von farblos zu gelb und wieder zu farblos beobachtet. Nach der Zugabe des (S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-iodpropansäuremethylesters (**100**) (500.0 mg, 1.52 mmol, 1.0 eq.) erwärmte sich die Suspension leicht und wurde weitere 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden Bis(dibenzylidenaceton)palladium(0) (175.5 mg, 0.15 mmol, 0.1 eq.), Dicyclohexyl[2',6'-dimethoxy(1,1'-biphenyl)-2-yl]phosphan (93.5 mg, 0.23 mmol, 0.15 eq.) und 5-Bromo-1,1,3,3-tetramethylisoindolin (**99**) (772.2 mg, 3.04 mmol, 2.0 eq.) zugeben und die Reaktionslösung 3 h auf 50 °C erhitzt. Feststoffe wurden mittels Filtration über Celite® abgetrennt und mit Ethylacetat eluiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1) gereinigt. Das Produkt wurde als leicht gelbliches Öl (56%, 320.0 mg, 0.85 mmol) erhalten. $R_f = 0.20$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): 7.02 – 6.97 (m, 2H, Aryl-H), 6.83 (bs, 1H, Aryl-H), 4.99 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H, BocNH), 4.59 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 1H, α -CH), 3.70 (s, 3H, -COOMe), 3.13 – 3.04 (m, 2H, β -CH₂), 2.04 (bs, 1H, NH), 1.42 – 1.36 (m, 21H, -C(CH₃)₃ und Pyrrol-CH₃) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): 172.47, 155.13, 149.22, 147.64, 135.02, 128.37, 122.46, 121.57, 79.96, 62.75, 62.73, 54.55, 52.25, 38.28, 31.99, 31.97, 28.41, 27.00 ppm. MS (ESI): m/z : 377.09 [$\text{M} + \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4$ [$\text{M} + \text{H}^+$]: 377.24348; 377.24373 gefunden. Bestimmung des spezifischen Drehwinkels: 31.8 mg in 1.5 mL Chloroform gelöst; Wellenlänge 589 nm; 20.0 °C; gemessener Drehwinkel = 0.724 °; $[\alpha]^{20} = 34.15$ °.

(S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[1,1,3,3-tetramethylisoindolin-2-oxyl-5-yl]propansäuremethylester (102)



Zu der auf 0 °C gekühlten Lösung aus Verbindung **101** (590.0 mg, 1.57 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL trockenem Dichlormethan wurde *meta*-Chlorperbenzoesäure (702.4 mg, 3.13 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Hierbei verfärbte sich das Reaktionsgemisch von farblos zu gelb und schließlich zu braun. Die organische Phase wurde mit 20 mL 10 M Kaliumhydroxidlösung gewaschen und die wässrige Phase zweimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Das Produkt konnte nach Umkristallisation aus *n*-Hexan als gelber Feststoff (90%, 548.0 mg, 1.40 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.33$ (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1). Smp.: 85 – 86 °C. EA: errechnet für $C_{21}H_{31}N_2O_5$ C: 64.43, H: 7.98, N: 7.16; gefunden C: 64.10, H: 7.85, N: 6.90.

(S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[1,1,3,3-tetramethylisoindolin-2-oxyl-5-yl]propansäure (103)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung des Isoindolinradikals **102** (500.0 mg, 1.28 mmol, 1.0 eq.) in 10 mL eines Tetrahydrofuran/Methanol/Wasser-Gemischs (2:1:1) wurde Lithiumhydroxid (61.2 mg, 2.55 mmol, 2.0 eq.) zugegeben und für 150 min bei Raumtemperatur gerührt. Die vollständige Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 1 M Salzsäure angesäuert und die wässrige Phase dreimal mit je 40 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinte organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Dichlormethan/Methanol 9:1). Das Produkt konnte als gelber Feststoff (90%, 432.0 mg, 1.14 mmol) isoliert werden. $R_f = 0.40$ (Dichlormethan/Methanol 9:1). Das Radikal wurde für die spektroskopische Untersuchung mittels NMR zuvor mit Ascorbat zum Hydroxylamin reduziert. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_3): 7.19 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.14 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, Aryl-H), 7.09 (bs, 1H, Aryl-H), 4.33 – 4.30 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.16 (dd, $^2J = 5.3$ Hz, $^3J = 13.7$ Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.93 (dd, $^2J = 8.5$ Hz, $^3J = 13.4$ Hz, 1H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.49 – 1.47 (m, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40 – 1.32 (m, 12H, Pyrrol- CH_3) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD-d_3): 197.33, 157.55, 143.57, 141.89, 139.73, 130.83, 126.10, 123.98, 122.78, 80.31, 71.90, 71.82, 56.91, 39.07, 35.38, 30.90, 29.07, 28.74, 26.02, 25.99. MS (ESI): m/z : 376.23 [$\text{M} - \text{H}^+$]. HRMS: errechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$ [M]: 377.20710; 377.20720 gefunden.

4.3 Synthese, Reinigung und Quantifizierung von RNA

Für die RNA-Synthese wurden ein Expedite Nucleic Acid Synthesis System von PerSeptive Biosystems (Expedite) und ein Applied Biosystems Modell 392 (ABI) verwendet. Für die Reinigung mittels HPLC wurde ein Jasco LC-900 HPLC-System mit einem Jasco UV-975-Detektor (Detektion bei 254 nm) verwendet. Die RP-HPLC wurde mit einer präparativen Phenomenex Jupiter 4 μm Proteo 90 Å (250 x 10 mm) Säule durchgeführt. Für den Anionenaustausch (AE) fand eine semipräparative BioLCTM DNAPac™ PA-100 (250 x 9 mm) Säule Verwendung. Alle RNA-Proben, kommend von der HPLC, wurden in einem SpeedVac (Christ oder Savant) konzentriert. Das Wasser, welches mit den RNA-Proben in Kontakt kommt, wurde mit Diethylcarbonat (DEPC) behandelt und vor der Verwendung autoklaviert. Alle wässrigen Stammlösungen enthalten ebenfalls DEPC-behandeltes Wasser. Sowohl beim Expedite Nucleic Acid Synthesis System von PerSeptive Biosystem als auch beim Applied Biosystem Modell 392 wurden die Standardprotokolle für einen 1 μmol -Maßstab verwendet. Unmodifizierte RNA/DNA-Phosphor-Amidite [Bz-A-CE, Ac-C-CE, G(dmf)-CE und U-CE (alle 2'-O-TBDMS-geschützt) sowie dT-CE] wurden von Link Technologies bezogen, ebenso der feste CPG-Träger für die selbstgepackten Säulen sowie Acetonitril, das als Lösungsmittel verwendet wurde. Der terminale Alkinlinker **X1** und das Cy5-Azid **X2** wurden von Lumiprobe bezogen, siehe hierzu Abbildung 122. Als modifiziertes Phosphoramidit wurde Verbindung **34** eingesetzt. 3%ige Trichloressigsäure in Dichlormethan (Deblock-Lösung) wurde für den Expedite von Sigma und für den ABI von emp Biotech bezogen. Essigsäureanhydrid in THF (Cap A), *N*-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B) und Iod in Pyridin/H₂O/THF (Oxidationsmittel) wurden beide von JT Baker bezogen. 0.3 M 5-Benzylthio-1-*H*-tetrazol in Acetonitril (Aktivator) wurde bei Link Technologies bestellt.

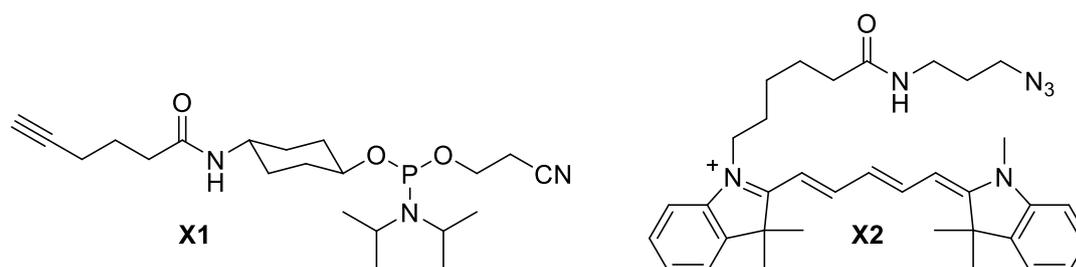


Abbildung 122: Struktur des eingesetzten terminalen Alkins **X1** sowie des Cy5-Azids **X2**.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten RNA-Stränge und deren Modifikationen sind in Tabelle 10 zusammengefasst, zudem sind sie in ihrer Sekundärstruktur in Abbildung 123 aufgeführt. Zum Isolieren der RNA musste diese zunächst vom Festphasenmaterial abgespalten werden. Hierzu wurde das CPG von der Säule in Eppendorfreagiergefäße überführt, mit 2 mL einer Mischung aus Ethanol und 32%igem Ammoniak (1:3) suspendiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Festphasenmaterial wurde noch zweimal mit

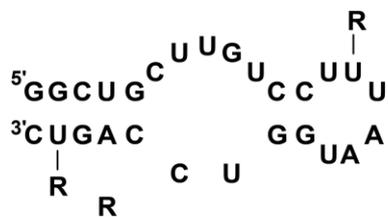
Wasser gewaschen und die kombinierten Fraktionen getrocknet. Um die 2'-Silylschutzgruppen zu entfernen wurde der Rückstand in 300 µL einer Mischung bestehend aus *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP), Triethylamin (TEA) und Triethylamintrihydrofluorid im Verhältnis 6:3:4 für 90 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 1.2 mL *n*-Butanol zugegeben und die Suspension für 72 h bei -20 °C gelagert. Durch Zentrifugieren der Suspension bei 18620 g und 4 °C für 90 min wurde das Präzipitat sedimentiert und der klare Überstand konnte verworfen werden.

Tabelle 10: Synthetisierte RNA-Stränge und deren Modifikation.

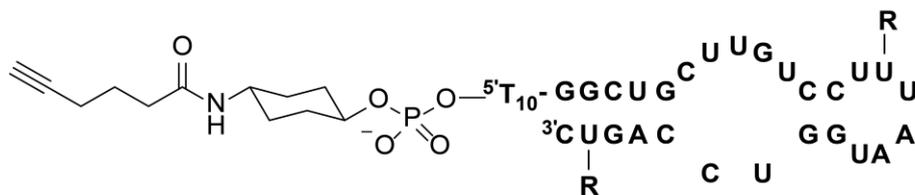
RNA	Sequenz	Modifikation
I	5'-CGGAUGACCGGUCA X CCG-3'	X = geschützter Spinlabel
V	5'-CGGAUGACCGGUCAUCCG-3'	Keine (gekauft)
VI	5'-GGCUGCUUGUCCU X UAAUGGUCCAG X C-3'	X = geschützter Spinlabel
VII	5'- Y TTTTTTTTTGGCUGCUUGUCCUUAUGGUCCAGUC-3'	Y = terminales Alkin
VIII	5'- Y TTTTTTTTTGGCUGCUUGUCCU X UAAUGGUCCAG X C-3'	X = geschützter Spinlabel Y = terminales Alkin



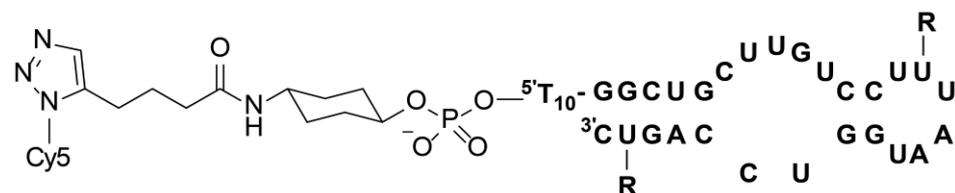
V: R = H I: R = geschützter Spinlabel III: R = freier Spinlabel



VI: R = geschützter Spinlabel XI: R = freier Spinlabel



VII: R = H VIII: R = geschützter Spinlabel XII: R = freier Spinlabel



IX: R = H X: R = geschützter Spinlabel XIII: R = freier Spinlabel

Abbildung 123: Sekundärstrukturen der synthetisierten RNA-Stränge.

Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mittels HPLC gereinigt. Bedingungen für die AE-HPLC: RNA I: A: Wasser, B: 1 M LiCl; Gradient: 0 – 70% B binnen 32 min; Flussrate: 5 mL/min; alle anderen RNAs **VI**, **VII** und **VIII**: A: Wasser, B: 1 M LiCl; Gradient: 0 – 80% B binnen 50 min; Flussrate: 5 mL/min. In allen Fällen wurde die HPLC-Säule auf 80 °C erhitzt. Die anschließende Trennung mittels

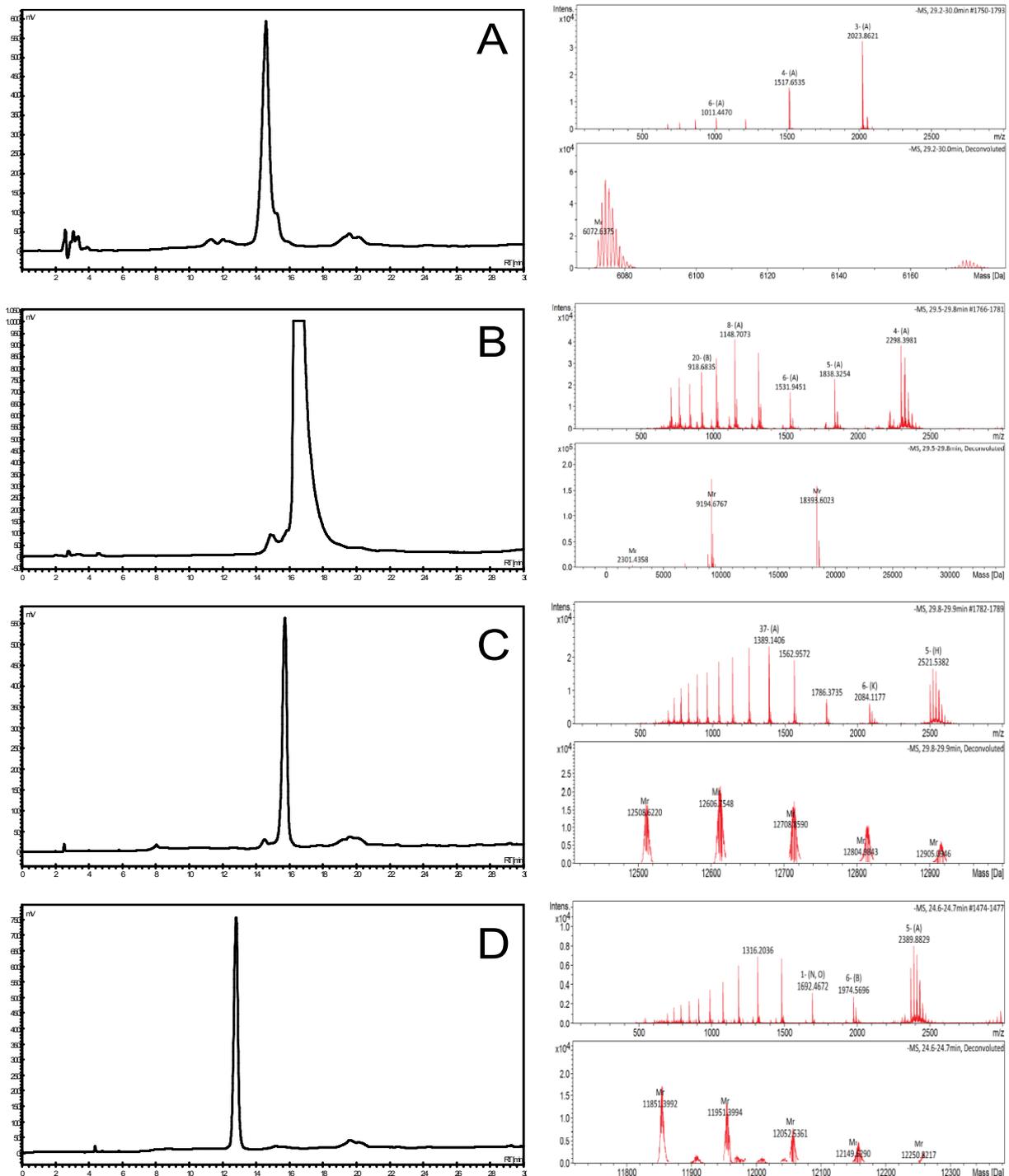


Abbildung 124: RP-HPLC und Massenspektren der isolierten RNA-Stränge. **A:** 18mer I (ein Spinlabel), errechnete Masse: 6071.9 g/mol; gefundene Masse: 6072.6 g/mol; **B:** Neomycin-Aptamer VI (zwei Spinlabel), errechnete Masse: 9192.4 g/mol; gefundene Masse: 9194.7 g/mol und 18393.6 g/mol (doppelte Molmasse); **C:** Neomycin-Aptamer VIII (zwei Spinlabel mit Alkinlinker), errechnete Masse: 12503.9 g/mol; gefundene Masse: 12508.6 g/mol; **D:** Neomycin-Aptamer VII (kein Spinlabel mit Alkinlinker), errechnete Masse: 11847.6 g/mol; gefundene Masse: 11851.4 g/mol. Die Massenspektren der RNAs VII und VIII zeigen ebenfalls Triethylaminaddukte.

RP-HPLC dient dem Abtrennen des LiCl zur weiteren Reinigung. Bedingungen für die RP-HPLC aller RNAs: A: Hexafluorisopropanol (HFIP)/TEA-Puffer (400 mM HFIP, 16.2 mM TEA, pH = 7.8), B: Methanol; Gradient: 5 – 95% B binnen 28 min; Flussrate: 4 mL/min. In allen Fällen wurde die HPLC-Säule auf 60 °C erhitzt. Die Konzentration der isolierten RNA-Proben wurden über UV-Spektroskopie an einer Nanodrop 2000c von Thermo Fisher unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Der Extinktionskoeffizient wurde anhand des Nächsten-Nachbar Modells gemäß Cantor *et al.*³²⁶ bestimmt. Für das modifizierte Nukleotid wurde dasselbe Inkrement, wie für das Unmodifizierte angenommen. Die Oligonukleotide wurden mittels Massenspektrometrie verifiziert (siehe Abbildung 124). Hierbei kam ein Agilent 1200 Series LC System sowie ein microTOF-Q II zum Einsatz. HPLC-Säule: XBridge Peptide BEH C18 (300 Å, 3.5 µM, 250 mm, x 2.1 mm). HPLC-Bedingungen: A: Methanol, B: HFIP/TEA (400 mM HFIP, 16.2 mM TEA, pH = 7.8); Gradient: 5% A von 0 – 5 min, 5 – 20% A von 5 – 7 min, 20 – 60% A von 7 – 22 min; Flussrate: 0.25 mL/min.

4.4 Photochemische Entschützung

Durch Bestrahlung der RNA-Proben **I**, **VI** und **VIII** wurden diese in die entschützten Spezies überführt. Das Freisetzen des Radikals wurde mit Hilfe eines selbst gebauten Geräts erreicht, welches mit drei LEDs (Nichia NCCU033, 365 nm, jede LED mit 100 mW)²⁵¹ ausgestattet war. Die NBOM-geschützten RNA-Proben wurden für 20 min in Puffer (100 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH = 7.8) bestrahlt. Die Bestrahlung wurde in verschließbaren Rundglasküvetten (Carl Roth, 50 mm x 10 mm) durchgeführt, um ein Verdunsten der Lösung sowie eine Kontamination der Probe zu verhindern. Anschließend wurden die Proben in einem Biometra T-Personal Thermocycler erhitzt und langsam wieder abgekühlt, um einerseits die Eliminierung des Halbacetals zu begünstigen und andererseits die korrekte Sekundärstruktur zu favorisieren. Das entsprechende Protokoll²⁹⁹ ist in Tabelle 11 aufgeführt. Spinlabel wie Verbindung **rac-62**, welche nicht an eine RNA gekuppelt wurden, wurden unter Anpassung des Bestrahlungspuffers, sofern diese nicht im ursprünglichen Puffer löslich sind, analog behandelt. Der Label wurde hierfür zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit dem Puffer verdünnt, so dass die Probe zu 10% aus DMSO besteht.

Tabelle 11: Annealingprotokoll für markierte RNA-Proben.

Zeit [min]	Temperatur [°C]	Gradient [°C/s]
	20.0 → 90.0	3.0
70.0	90.0	
	90.0 → 20.0	0.1
1.0	20.0	
	20.0 → 16.0	3.0

Die fertigen Proben wurde nochmals mittels RP-HPLC überprüft. Bedingungen für RP-HPLC: A: HFIP/TEA (400 mM HFIP, 16.2 mM TEA, pH = 7.8), B: Methanol; Gradient: 5 – 95% B binnen 28 min; Flussrate: 4 mL/min; Temperatur: 60 °C. Es konnte kein degradiertes Spinlabel der allgemeinen Form **IV** gefunden werden (siehe Abbildung 68).

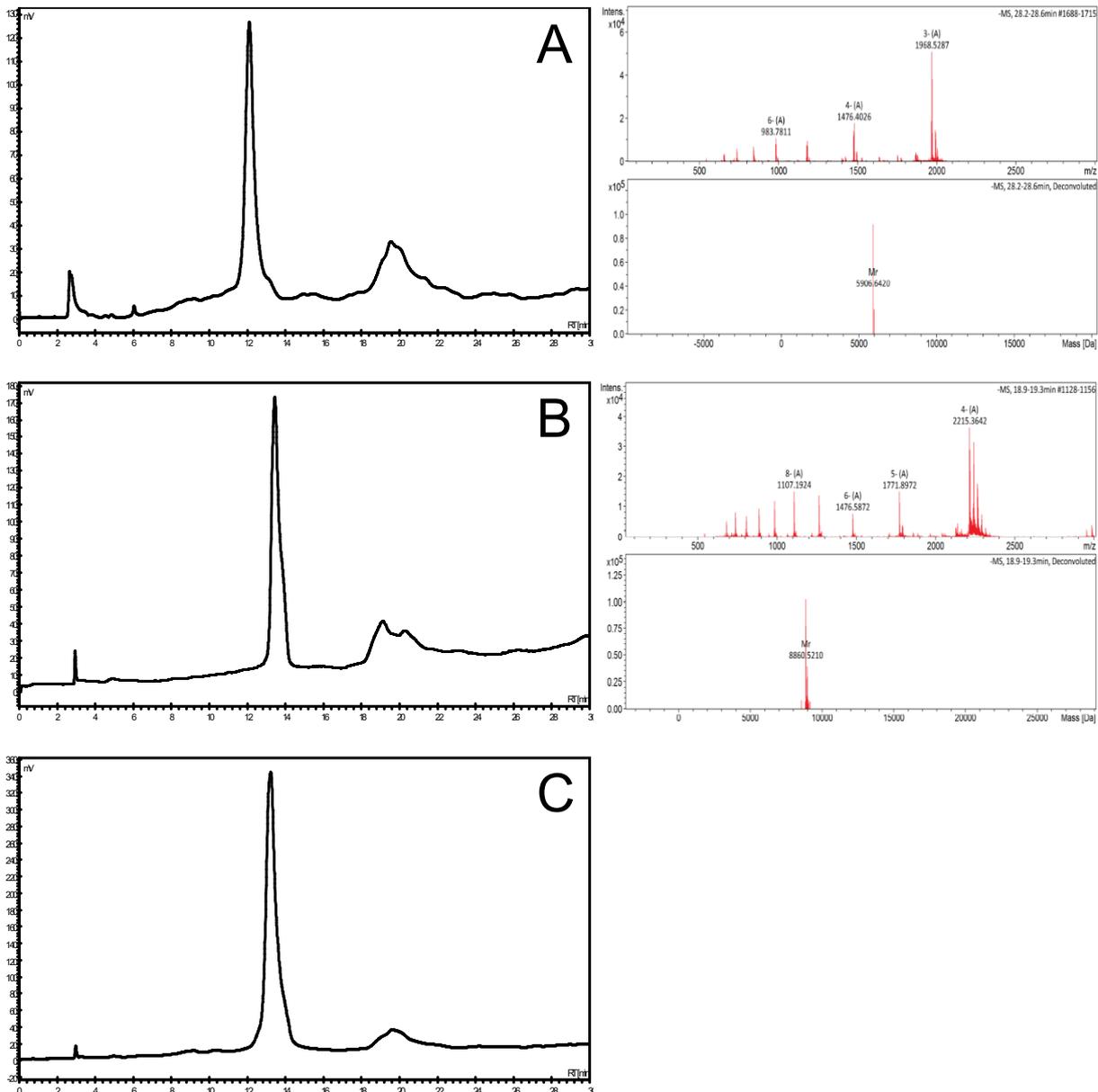


Abbildung 125: RP-HPLC und Massenspektren der bestrahlten RNA-Proben. **A:** 18mer **III** (ein Spinlabel), errechnete Masse: 5905.9 g/mol; gefundene Masse: 5906.6 g/mol; **B:** Neomycin-Aptamer **XI** (zwei Spinlabel), errechnete Masse: 8860.3 g/mol; gefundene Masse: 8860.5 g/mol; **C:** Neomycin-Aptamer **XII** (zwei Spinlabel und Alkinlinker). Nach der Entschützung von RNA **VIII** wurde diese sofort mit dem Cy5-Azid in einer Click-Reaktion zu RNA **XIII** umgesetzt (siehe Abschnitt 4.6). Zwischen Minute 18 und 23 sorgt die rasche Änderung des Lösemittelgradienten für die Absorption, nicht die aufgegebene Probe.

4.5 Duplex–versus Hairpinstabilität des palindromischen Oligonukleotids III

Die einfach spinmarkierte RNA III besitzt eine palindromische Sequenz, so dass sie Duplexe oder Hairpins als mögliche Sekundärstruktur ausbilden kann. Mittels NUPACK wurde die RNA–Sequenz so gewählt, dass sie laut der Voraussage von NUPACK²⁶¹, zu einem überwiegenden Teil als Duplexstruktur vorliegen sollte. Um die Voraussage zu überprüfen, wurde ein natives PAGE–Gel (12% Acrylamid) durchgeführt. Als bildgebendes Reagenz wurde Sybr Gold eingesetzt. (siehe Abbildung 126).

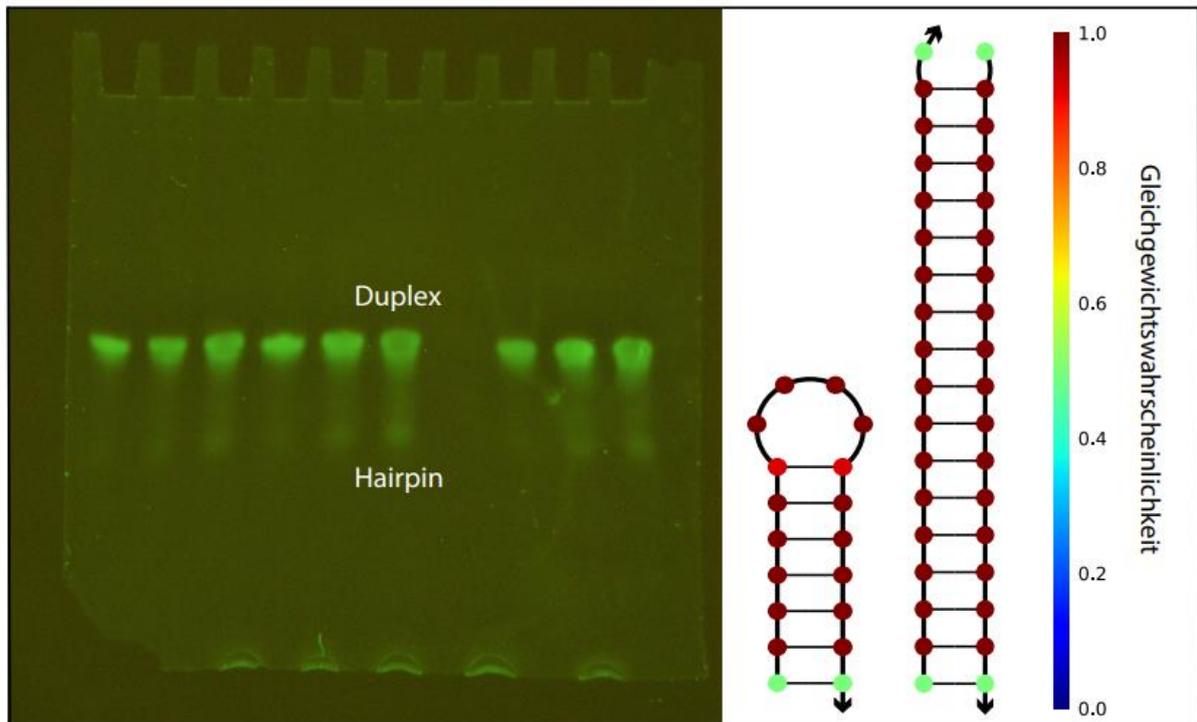


Abbildung 126: Links: Natives PAGE–Gel von RNA III in verschiedenen Konzentrationen. Palindromische Sequenzen können sowohl Duplexe als auch Hairpinstrukturen ausbilden. Die dominierende Spezies, in Form des langsamen laufenden Spots, ist der Duplex. Rechts: Voraussage von NUPACK²⁶¹. Freie Energie für den Hairpin: -8.00 kcal/mol. Freie Energie für den Duplex: -34.78 kcal/mol.

4.6 Cy5–Markierung und in–line probing

Für Experimente mittels in–line probing ist es zwingend erforderlich, sofern kein intrinsischer Fluorophor vorhanden ist, einen in die Probe zu integrieren. In diesem Fall werden die mit einem terminalen Alkin modifizierten RNA–Proben **VII** und **XII** über eine kupfervermittelte Click–Reaktion an ein Cy5–Azid gekuppelt. Da die photochemische Entschützung der Spinlabel zu einem Ausbleichen des Cy5–Farbstoffes führen würde, erfolgt der Konjugationsschritt auf die Entschützung. Die folgenden Stammlösungen wurden verwendet, um die erwünschte Konzentration der einzelnen Reagenzien zu erzielen. Die Click–Ansätze umfassen jeweils ein Volumen von 200 μL .

Table 12: Verwendete Reagenzien zur Konjugation von Cy5–Azid mit den RNA–Proben **VII** und **XII**.

Reagenzien	Stammlösung	Endkonzentration
Oligonukleotid	Variiert	20 μM
DMSO	Reinsubstanz	50 vol%
Cu–TBTA–Komplex	10 mM in DMSO/Wasser (55:45)	0.5 mM
Cy5–Azid	10 mM in DMSO	30 mM
Ascorbinsäure	5 mM	0.5 mM
TEAA	1 M	0.2 M

Beginnend mit der in Wasser gelösten RNA–Probe wurde diese mit TEAA–Puffer (pH = 7.0) verdünnt. DMSO, Cy5–Azid und die Ascorbinsäure wurden in dieser Reihenfolge nacheinander zugegeben. Nach jedem Hinzufügen eines Reagenzes wurde die Reaktionslösung homogenisiert und zum Schluss restliche Luft durch Argon verdrängt. Die Reaktion wurde für 72 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 20 μL 3 M Natriumacetatlösung (pH = 6.9) und 1 mL trockenem Ethanol (bedingt durch die höhere Reinheit) vermengt. Nach Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min wurde die Suspension für 90 min bei 18620 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das blaue Pellet wurde mit 1 mL trockenem Ethanol gewaschen und erneut bei 18620 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Cy5 markierte RNA wurde noch mittels einem 16%igen denaturierenden PAGE gereinigt. Die folgenden RP–Chromatogramme erfolgten mit Proben vor der PAGE–Reinigung (siehe Abbildung 127).

Nach Reinigung der RNA-Proben wurden diese mit einem Spaltpuffer (50 mM Tris-HCl (pH = 8.3), 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl) vermischt. Das Probenvolumen umfasst hierbei 10 µL mit einer Endkonzentration von 150 nM der RNA. Die Proben wurden für 20 h bei 37 °C oder für 110 h bei 4 °C inkubiert. Für die entsprechenden Kontrollen wurde der Spaltpuffer gegen einen 50 mM Tris-HCl Puffer (pH = 8.0) ausgetauscht, wobei die Inkubationsbedingungen unverändert blieben. Vor der Gelelektrophorese wurde ein Probenvolumen Harnstoff-Ladepuffer x2 (8 M Harnstoff, 20 mM EDTA (pH = 8.0), 0.2% Crocein Orange G) zu jeder Probe gegeben und 10 µL dieser Mischung auf ein denaturierendes PAGE (16% bzw. 12% Acrylamid, 7 M Harnstoff) geladen. Folgende Laufbedingungen wurden für den Sequenzierer (ALFexpress, Amersham Biosciences) gewählt: 1500 V (maximal), 60 mA (maximal), 30 W (konstant), 55 °C, 2 s Abstandsintervall, 450 min Laufzeit. Die resultierenden Ergebnisse wurden mit der entsprechenden Hydrolyseleiter abgebildet (siehe Abbildung 128). Die Hydrolyseleiter stammt aus der teilweisen Hydrolyse der RNA-Stränge **IX** und **XIII**.

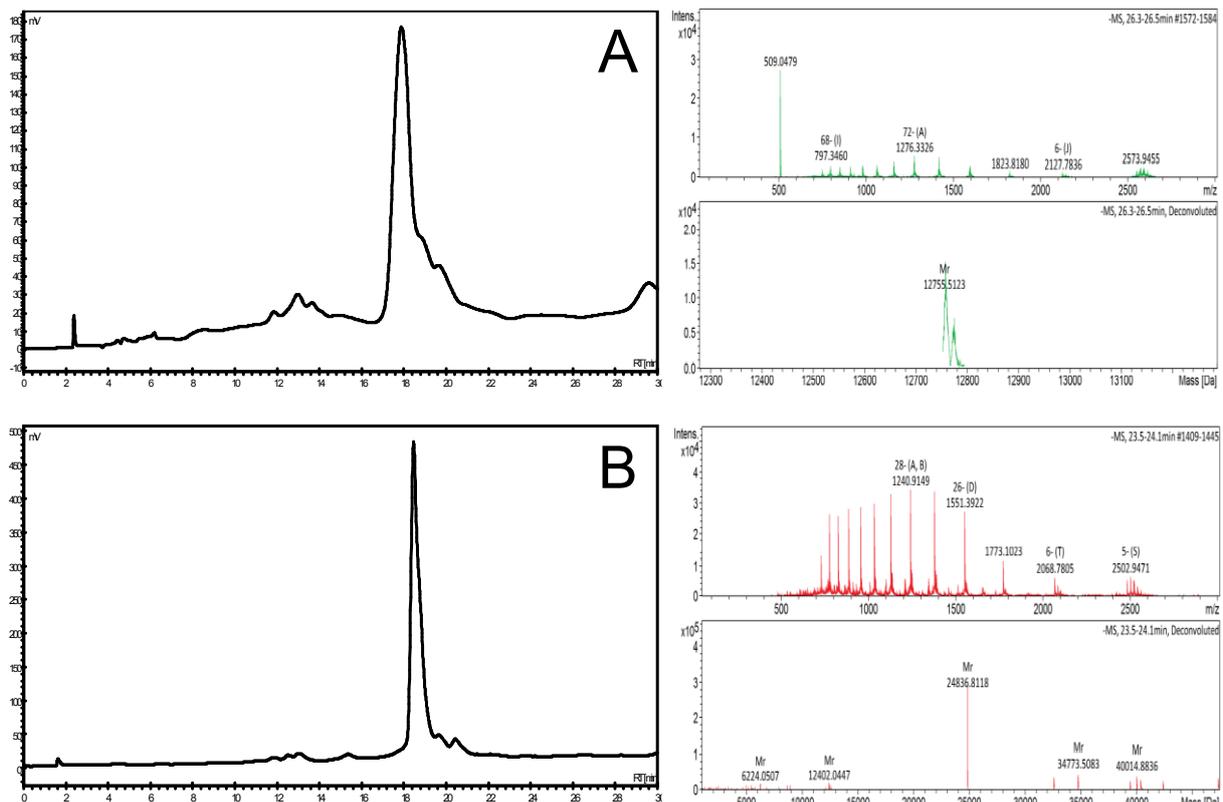


Abbildung 127: **A:** RP-HPLC-Chromatogramm nach Click-Reaktion des Spin-markierten Neomycin-Aptamers **XIII** und das entsprechende Massenspektrum (errechnet: 12737.2 g/mol; gefunden: 12755.5 g/mol (M + Na⁺)); **B:** RP-HPLC-Chromatogramm nach Click-Reaktion des Neomycin-Aptamers **IX** und das entsprechende Massenspektrum, welches nach dem Dekonvolvieren hauptsächlich die doppelte Masse zeigt (errechnet: 12413.0 g/mol; gefunden: 24836.8 g/mol (2M + Na⁺)).

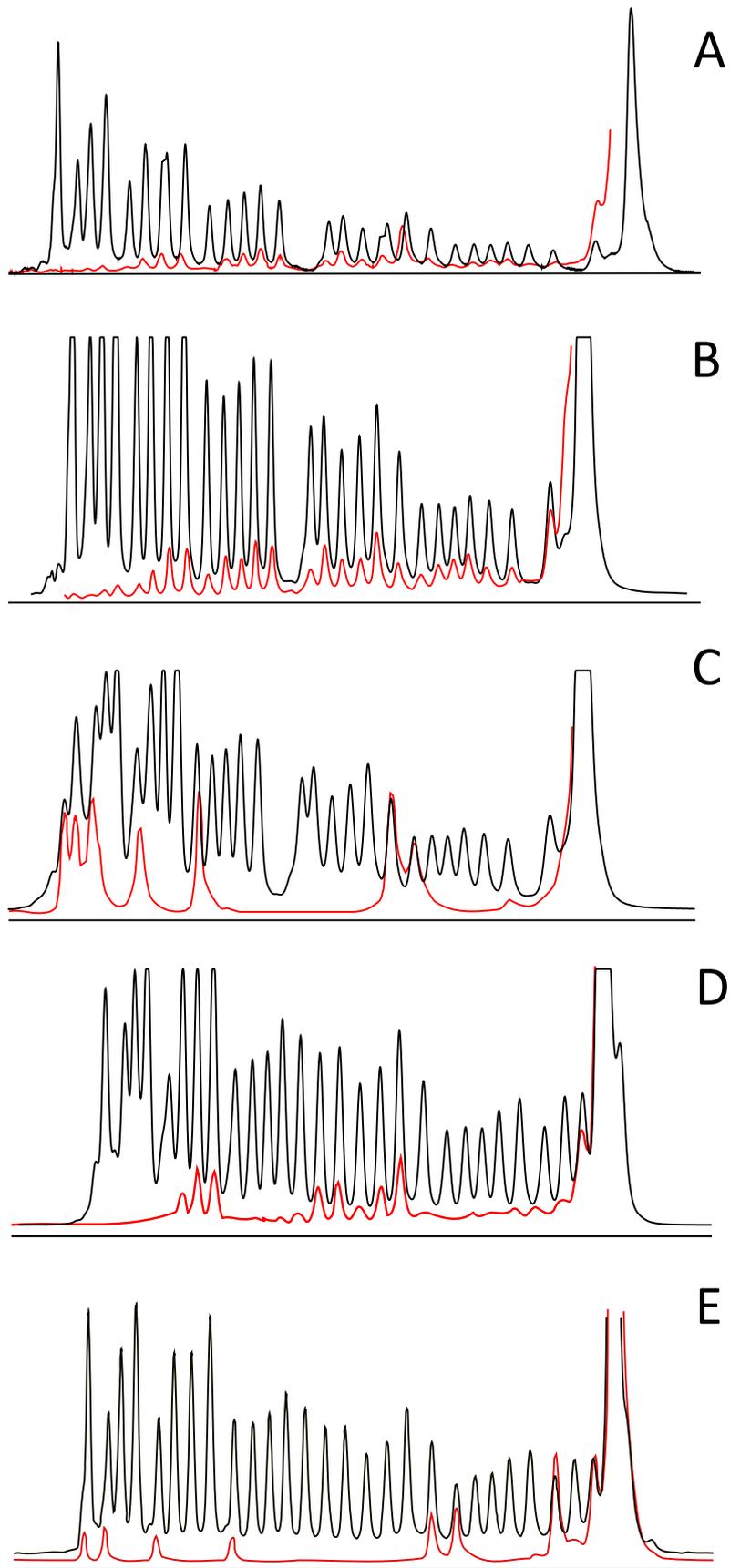


Abbildung 128: **A:** In-line probing von RNA XIII (rot Kurve; zwei TPA-Label) bei 4 °C; **B:** In-line probing von RNA XIII (rot Kurve; zwei TPA-Label) bei 37 °C; **C:** Teilweiser RNase T1-Verdau von RNA XIII (rote Kurve, zwei TPA-Label); **D:** In-line probing der unmodifizierten RNA IX (rote Kurve); **E:** Teilweiser RNase T1-Verdau von RNA IX (rote Kurve). Die schwarze Kurve repräsentiert in allen Fällen die Hydrolyseleiter des entsprechenden Laufs.

4.7 EPR–Messungen

cw–EPR–Spektroskopie. Die continuous wave (cw) Spektren wurden im X–Band (9.6 GHz) an einem Bruker EMXnano Spektrometer bei Raumtemperatur mit den folgenden Parametern gemessen: 2 mW Mikrowellenleistung, 1.0 G Modulationsamplitude, 100 KHz Modulationsfrequenz, 1.8 ms Zeitkonstante. Das Mittel aus vier Einzelmessungen mit einer Messdauer von jeweils 20 s ergibt die unten abgebildeten Spektren.

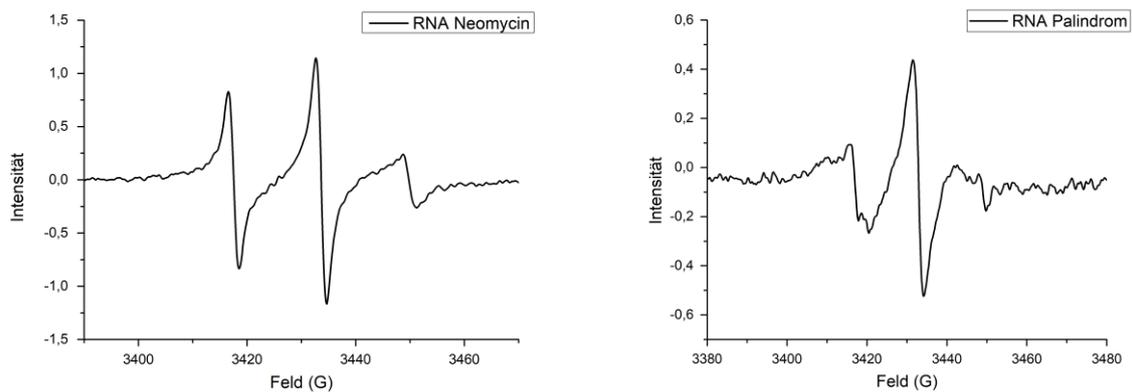


Abbildung 129: **Links:** cw–Spektrum vom Neomycin–Aptamer **XI**. **Rechts:** cw–Spektrum der palindromischen RNA–Sequenz **III**.

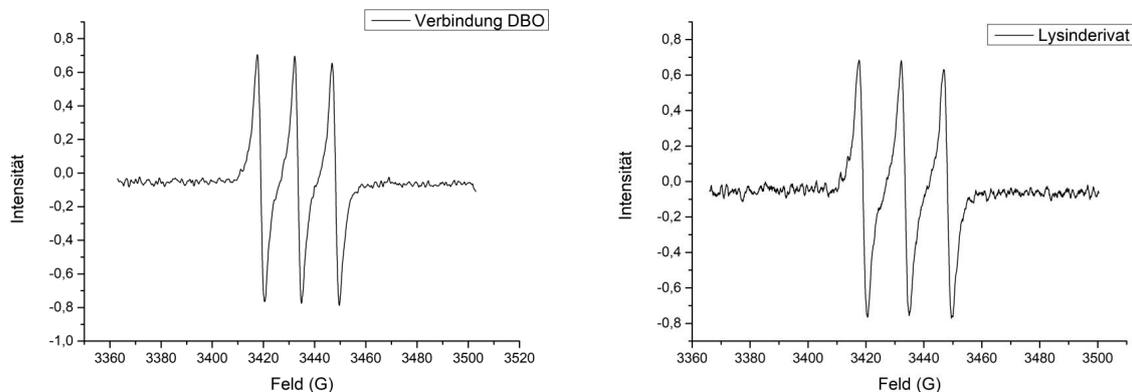


Abbildung 130: **Links:** cw–Spektrum von Verbindung **rac–62**. **Rechts:** cw–Spektrum von Verbindung **51** nach der Bestrahlung.

PELDOR–Spektroskopie. Nach Zugabe von 20% (v/v) deuteriertem Glycerol als Kryoprotektor wurden 10 μ L der RNA–Probe in ein Quarzröhrchen (Suprasil, Wilmad LabGlass) mit einem Außendurchmesser von 1.6 mm überführt, bei der angegebenen Temperatur temperiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. PELDOR–Spektren wurden im Q–Band (33.8 GHz) bei 50 K an einem Bruker ELEXSYS E580–Spektrometer, das mit einem Continuous–Flow–Helium–Kryostaten (CF935, Oxford Instruments), einem Temperaturkontrollsystem (ITC502, Oxford Instruments) und einem 150 W TWT–Verstärker (Applied Systems Engineering Inc. Instruments) unter Verwendung eines Bruker EN5107D2 Hohlraumresonators aufgenommen. Es fanden ausschließlich Rechteckpulse und eine separate (nicht

phasenstarre) mw-Quelle für die Pumpimpulse Verwendung. Die totzeitfreie Vier-Puls-PELDOR-Sequenz¹⁰⁰ wurde für alle Experimente verwendet mit Pulslängen von 22 ns (RNA III) bzw. 32 ns (RNA XI) für die Sondenpulse ($\pi/2$ und π) und 12 ns für den Pumpimpuls (π). Die Pumpimpulsfrequenz wurde auf das Maximum des mit dem Echo detektierten Feldspektrums und das Maximums des Resonatorprofils eingestellt. Die Frequenz der Sondenpulse war 80 MHz (RNA III) bzw. 70 MHz (RNA XI) niedriger als die Frequenz der Pumpimpulse. Um die Deuterium-Modulationen zu mitteln, wurde die erste Interpuls Verzögerung um 16 ns für acht Schritte erhöht. Alle Zeitspuren wurden mit einem zweistufigen Phasenwechsel (abwechselnd $\pi/2$ um 180°) aufgenommen.

PELDOR-Analyse. Jede PELDOR-Zeitspur wurde mittels Tikhonov-Regulierung (hier nicht gezeigt) unter Verwendung von DeerAnalysis 2022⁹⁷ analysiert. Zusätzlich wurde, um ein Vertrauensintervall für die Abstandsverteilung zu bekommen, jede Zeitspur mit der DEERNet-Methode (Spinach SVN Rev 5662) angepasst.³²⁷ Die DEERNet-Anpassung berücksichtigt die Dimensionalität des Hintergrunds, der in der Regel nahezu dreidimensional war.

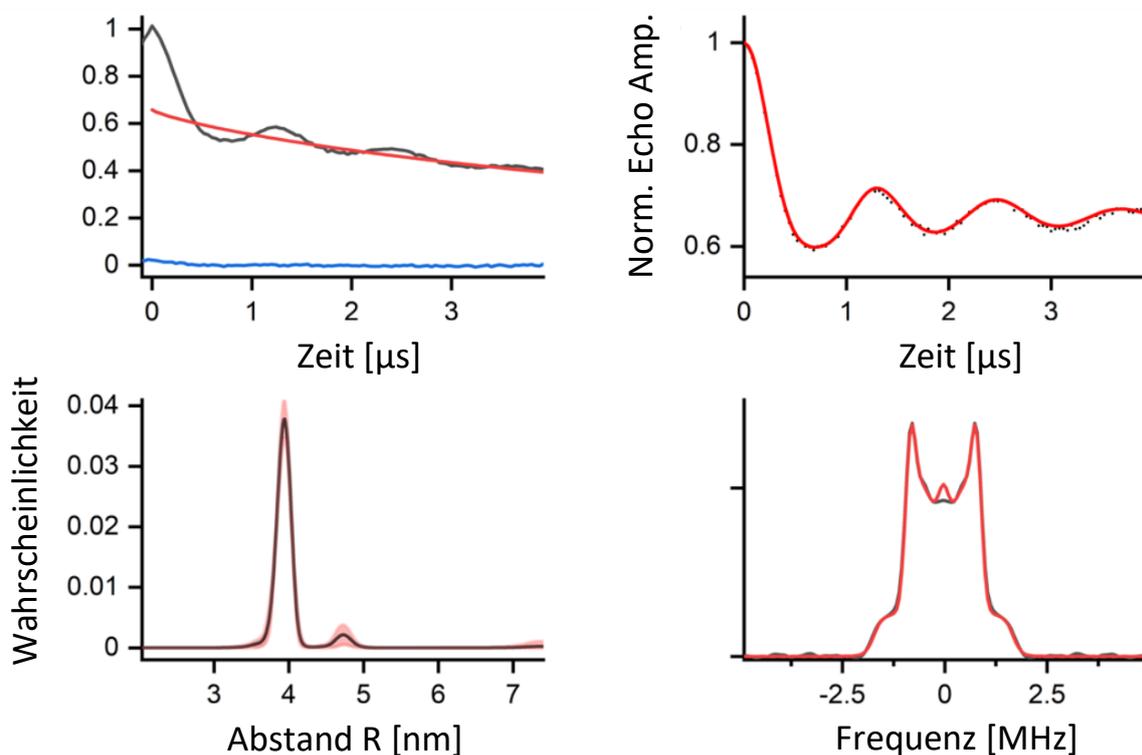


Abbildung 131: Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA III. **Oben links:** Normalisierte PELDOR-Zeitspur (schwarz: Realteil; blau: Imaginärteil) und in Rot der Hintergrund. **Oben rechts:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Unten links:** Abstandsverteilung (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). **Unten rechts:** Dipolares Peakmuster (schwarz: PELDOR, rot: DEERNet-Anpassung). Messzeit: 13 h.

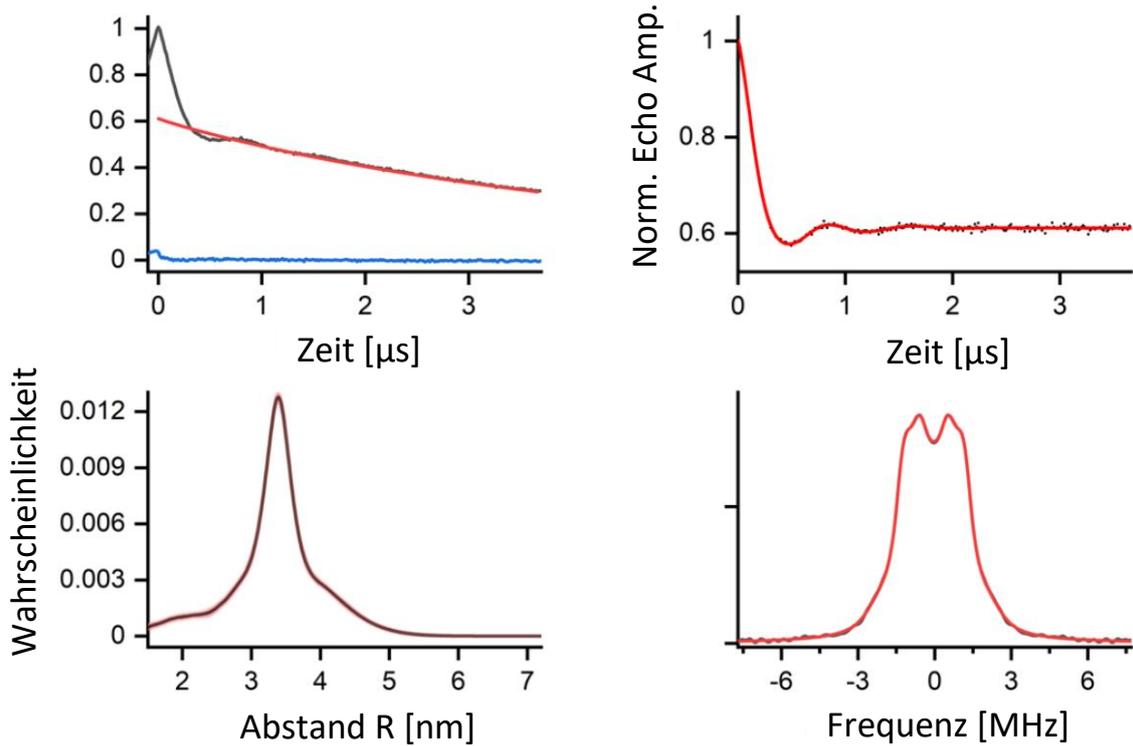


Abbildung 132: Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI. Die Probe wurde für 20 min bei 0 °C gelagert, bevor sie mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde. **Oben links:** Normalisierte PELDOR-Zeitspur (schwarz: Realteil; blau: Imaginärteil) und in Rot der Hintergrund. **Oben rechts:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Unten links:** Abstandsverteilung (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). **Unten rechts:** Dipolares Peakmuster (schwarz: PELDOR, rot: DEERNet-Anpassung). Messzeit: 15 h.

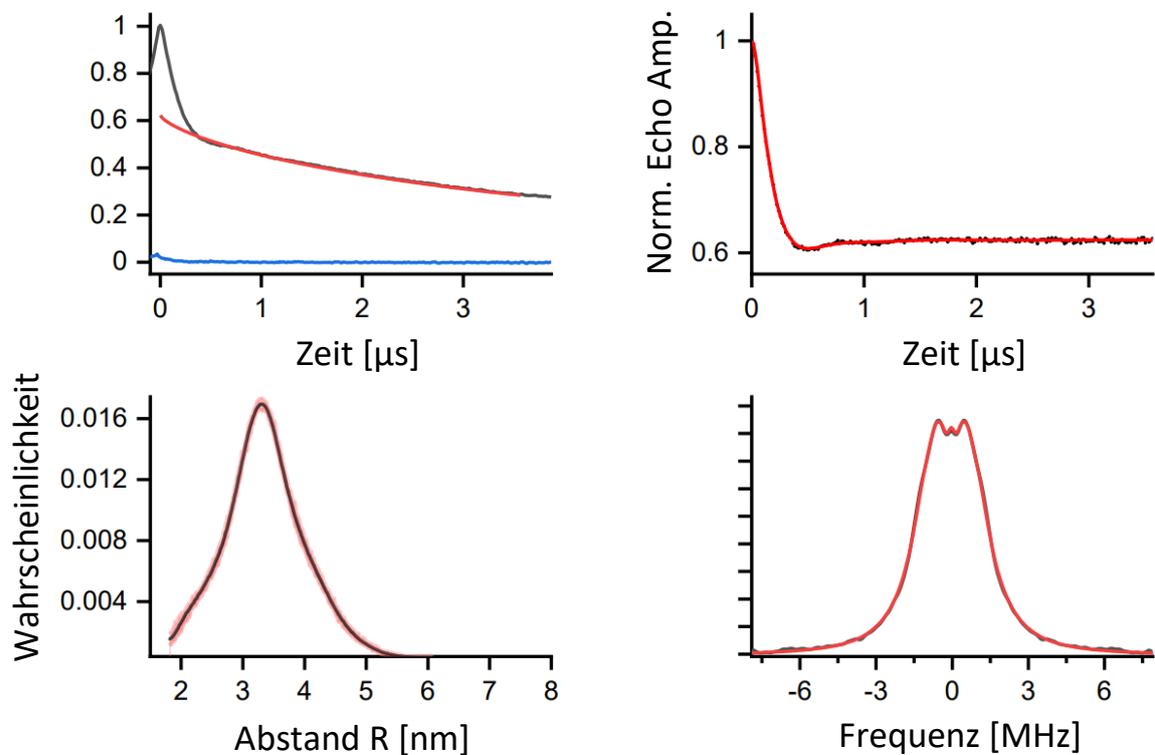


Abbildung 133: Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI: Kontrollexperiment Nr. 1. Die Probe wurde bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde. **Oben links:** Normalisierte PELDOR-Zeitspur (schwarz: Realteil; blau: Imaginärteil) und in Rot der Hintergrund. **Oben rechts:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Unten links:** Abstandsverteilung (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). **Unten rechts:** Dipolares Peakmuster (schwarz: PELDOR, rot: DEERNet-Anpassung). Messzeit: 13 h.

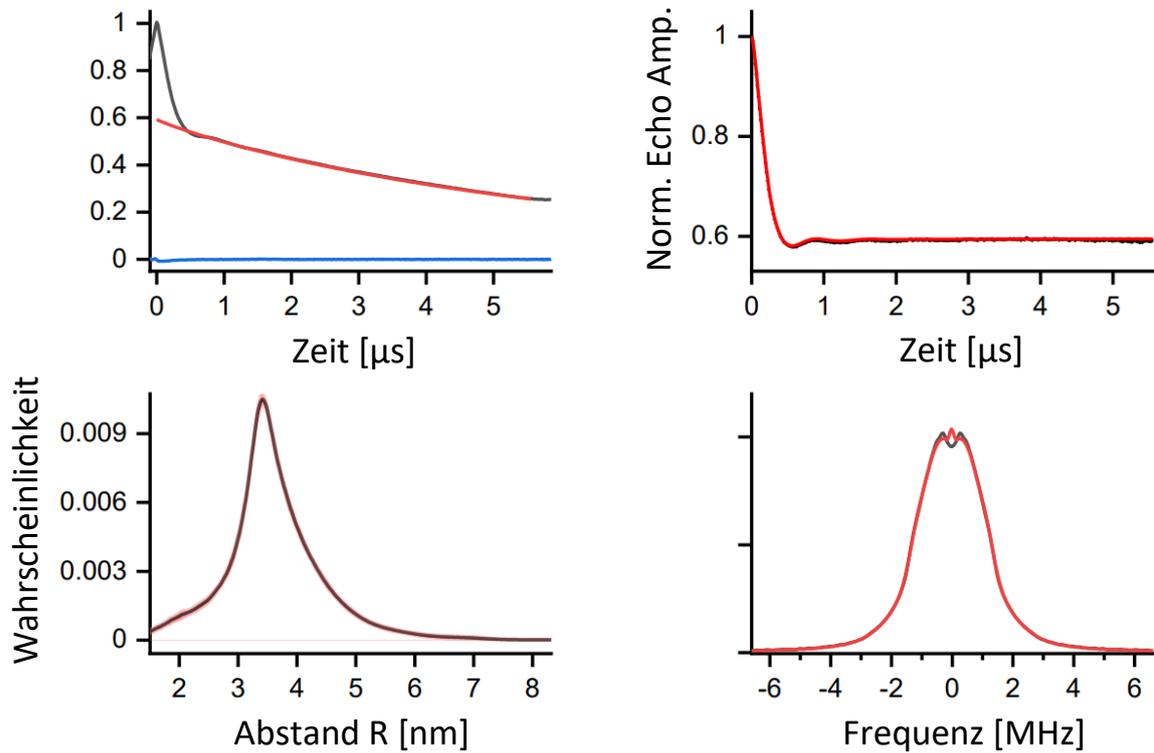


Abbildung 134: Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI: Kontrollexperiment Nr. 2. Die Probe wurde für acht Tage bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde. **Oben links:** Normalisierte PELDOR-Zeitspur (schwarz: Realteil; blau: Imaginärteil) und in Rot der Hintergrund. **Oben rechts:** Die um den Hintergrund korrigierte PELDOR-Zeitspur (schwarze Punkte) und die DEERNet-Anpassung (rot). **Unten links:** Abstandsverteilung (schwarz) und das 95%ige Vertrauensintervall (hellrot). **Unten rechts:** Dipolares Peakmuster (schwarz: PELDOR, rot: DEERNet-Anpassung). Messzeit: 13 h.

4.8 Schmelzpunktmessungen

Um die Stabilität der Sekundärstrukturen zu ermitteln und so den Einfluss der Label bzw. des Neomycin B zu zeigen, wurden die Schmelzpunkte der unterschiedlichen RNA-Stränge bestimmt. Die Schmelzkurven wurden an einem JASCO V-650 UV-VIS Doppelstrahlspektrometer aufgenommen. Die vermessenen Proben enthielten 1 μ M der entsprechenden RNA in einem Phosphatpuffer (100 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH = 7.4). Messungen die Neomycin B enthielten, wurden mit zehn Äquivalenten im Verhältnis zur RNA durchgeführt. Mit einem Temperaturgradienten von 1 $^\circ\text{C}$ pro Minute wurde die Änderung der Absorption bei 260 nm detektiert. Um Hystereseeffekte zu vermeiden, wurden die Schmelztemperaturen durch Anpassung von mindestens fünf unabhängigen Heiz- und Kühlzyklen an eine Sigmoidalfunktion (DoseResp) berechnet. Der Schmelzpunkt ergibt sich hierbei aus dem Wendepunkt der Funktion der Anpassung (Einzel und Kombination). Der experimentelle Fehler wurde anhand der Standardabweichung, die sich aus den einzelnen Heiz- und Kühlzyklen ergeben, ermittelt. Die zur Berechnung der Schmelzpunkte verwendeten Diagramme sind unten abgebildet (siehe Abbildung 135 ff.)

Tabelle 13: Zusammenstellung der einzelnen Schmelzpunkte sowie der daraus resultierende Schmelzpunkt inklusive Standardabweichung. ΔT_{m1} : Zunahme des Schmelzpunktes durch Zugabe von Neomycin B; ΔT_{m2} : Abnahme des Schmelzpunktes durch modifizierte Nukleotide.

Zyklus \ RNA	I	III	VII	VII + Neo	XII	XII + Neo
Heizen 1	83.6 $^\circ\text{C}$	82.6 $^\circ\text{C}$	52.2 $^\circ\text{C}$	68.4 $^\circ\text{C}$	49.6 $^\circ\text{C}$	63.4 $^\circ\text{C}$
Heizen 2	84.4 $^\circ\text{C}$	83.1 $^\circ\text{C}$	52.3 $^\circ\text{C}$	66.2 $^\circ\text{C}$	49.3 $^\circ\text{C}$	64.1 $^\circ\text{C}$
Heizen 3	83.6 $^\circ\text{C}$	82.2 $^\circ\text{C}$	52.4 $^\circ\text{C}$	66.5 $^\circ\text{C}$	49.5 $^\circ\text{C}$	63.7 $^\circ\text{C}$
Heizen 4	84.2 $^\circ\text{C}$	83.4 $^\circ\text{C}$	52.3 $^\circ\text{C}$	67.5 $^\circ\text{C}$	49.5 $^\circ\text{C}$	63.7 $^\circ\text{C}$
Heizen 5	84.2 $^\circ\text{C}$	83.6 $^\circ\text{C}$	52.3 $^\circ\text{C}$	67.1 $^\circ\text{C}$	49.4 $^\circ\text{C}$	63.7 $^\circ\text{C}$
Heizen 6	–	–	52.2 $^\circ\text{C}$	–	–	63.0 $^\circ\text{C}$
Kühlen 1	79.4 $^\circ\text{C}$	77.2 $^\circ\text{C}$	46.6 $^\circ\text{C}$	62.2 $^\circ\text{C}$	43.2 $^\circ\text{C}$	58.7 $^\circ\text{C}$
Kühlen 2	78.5 $^\circ\text{C}$	78.3 $^\circ\text{C}$	46.8 $^\circ\text{C}$	61.6 $^\circ\text{C}$	42.5 $^\circ\text{C}$	58.0 $^\circ\text{C}$
Kühlen 3	79.1 $^\circ\text{C}$	76.9 $^\circ\text{C}$	46.9 $^\circ\text{C}$	61.6 $^\circ\text{C}$	43.3 $^\circ\text{C}$	57.8 $^\circ\text{C}$
Kühlen 4	78.2 $^\circ\text{C}$	76.6 $^\circ\text{C}$	47.0 $^\circ\text{C}$	61.7 $^\circ\text{C}$	43.1 $^\circ\text{C}$	57.8 $^\circ\text{C}$
Kühlen 5	77.9 $^\circ\text{C}$	76.2 $^\circ\text{C}$	47.0 $^\circ\text{C}$	62.6 $^\circ\text{C}$	43.1 $^\circ\text{C}$	58.0 $^\circ\text{C}$
Kühlen 6	–	–	47.1 $^\circ\text{C}$	–	–	57.8 $^\circ\text{C}$
Schmelzpunkt	81.5 $^\circ\text{C}$	79.8 $^\circ\text{C}$	49.5 $^\circ\text{C}$	64.2 $^\circ\text{C}$	46.0 $^\circ\text{C}$	60.8 $^\circ\text{C}$
Standardabweichung	± 2.9 $^\circ\text{C}$	± 3.2 $^\circ\text{C}$	± 2.8 $^\circ\text{C}$	± 2.8 $^\circ\text{C}$	± 3.4 $^\circ\text{C}$	± 2.9 $^\circ\text{C}$
ΔT_{m1}	–		+14.7 $^\circ\text{C}$		+14.8 $^\circ\text{C}$	
ΔT_{m2}	–1.7 $^\circ\text{C}$		–		–3.5 $^\circ\text{C}$	–3.4 $^\circ\text{C}$

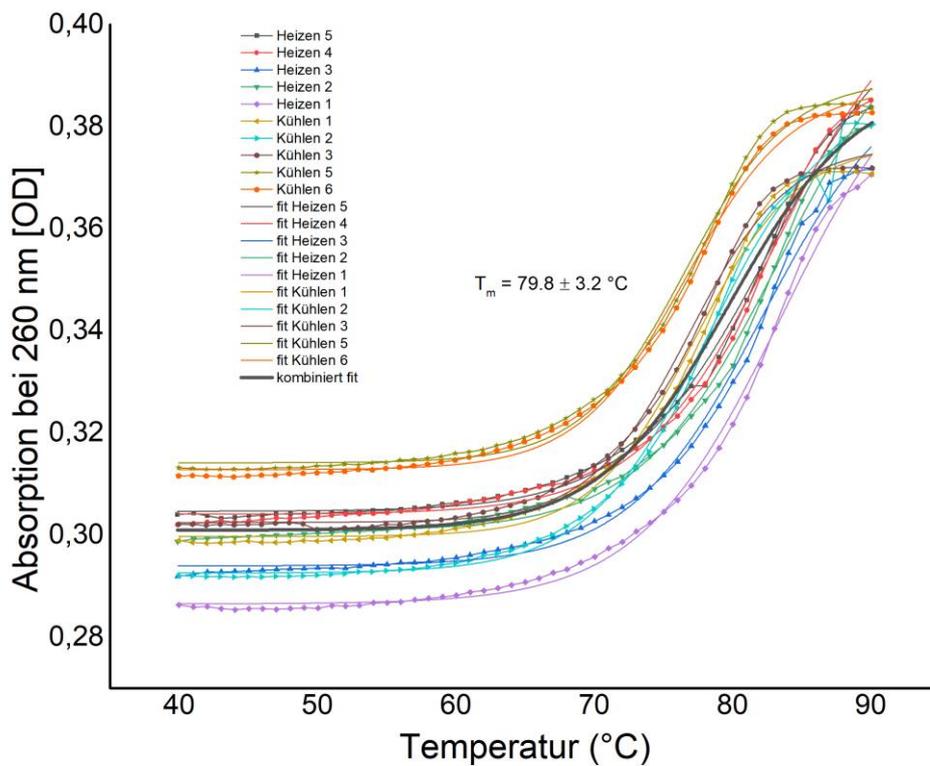
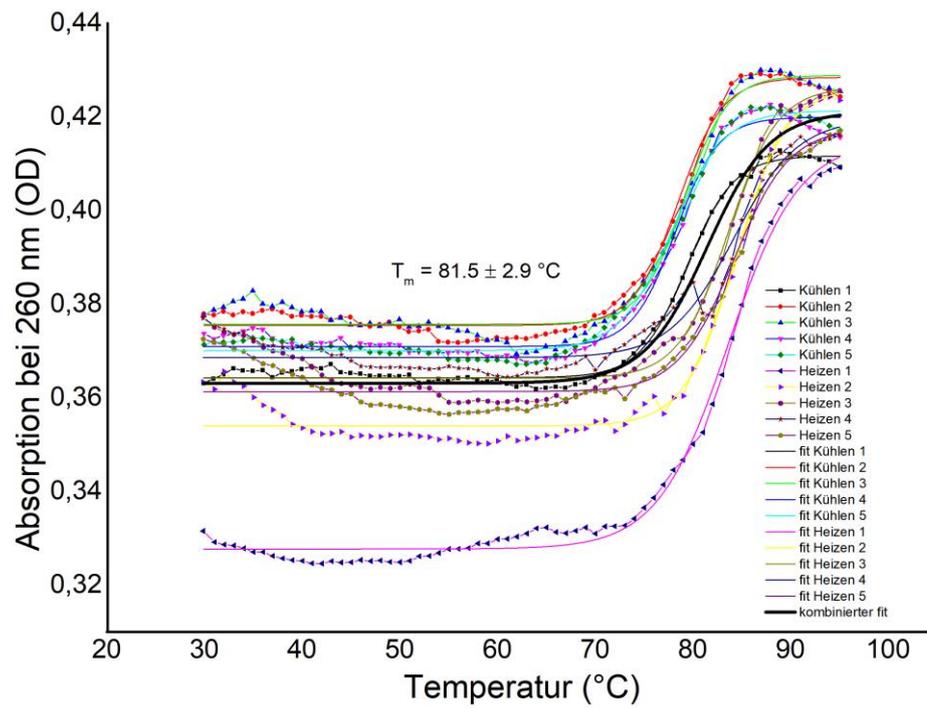


Abbildung 135: **Oben:** Schmelzkurven von RNA I. **Unten:** Schmelzkurven von RNA III.

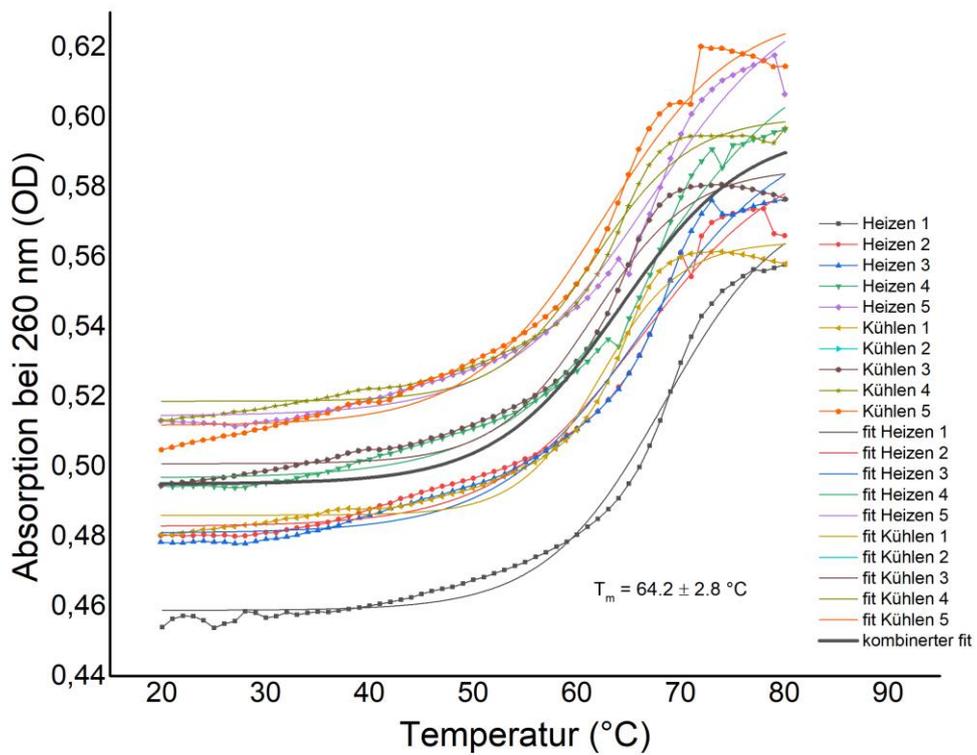
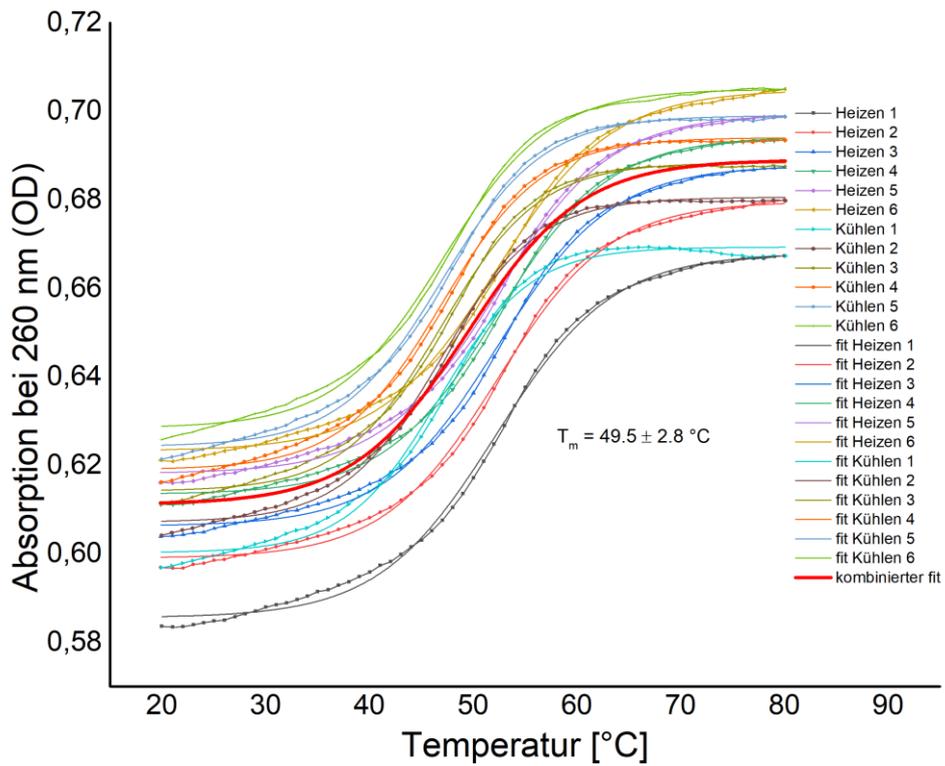


Abbildung 136: **Oben:** Schmelzkurven von RNA VII. **Unten:** Schmelzkurven von RNA VII mit Neomycin B.

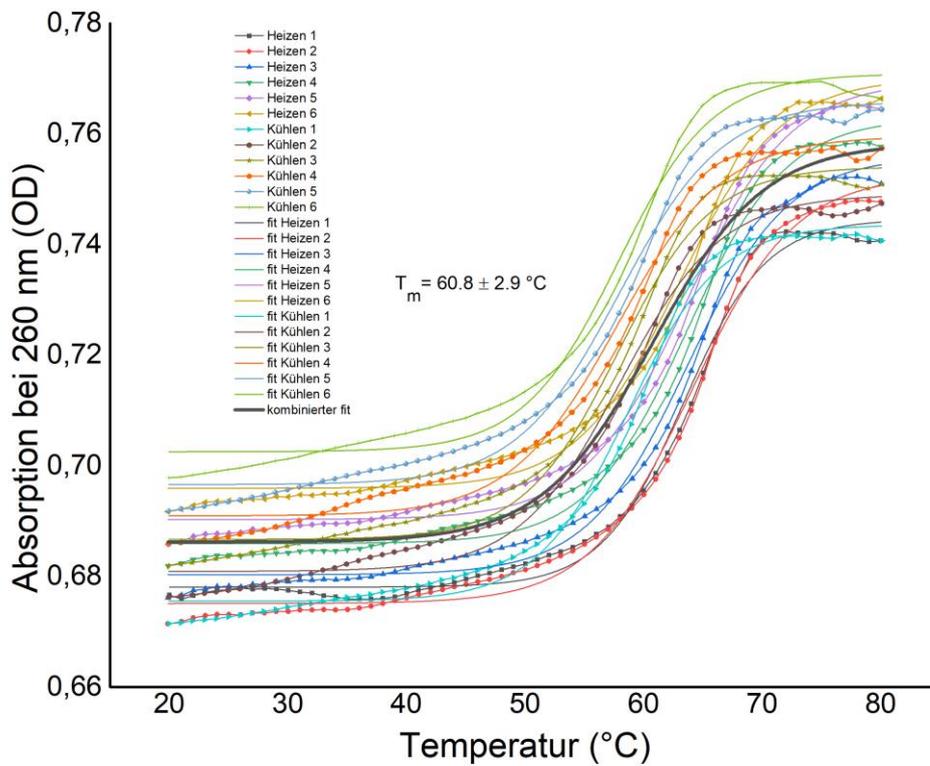
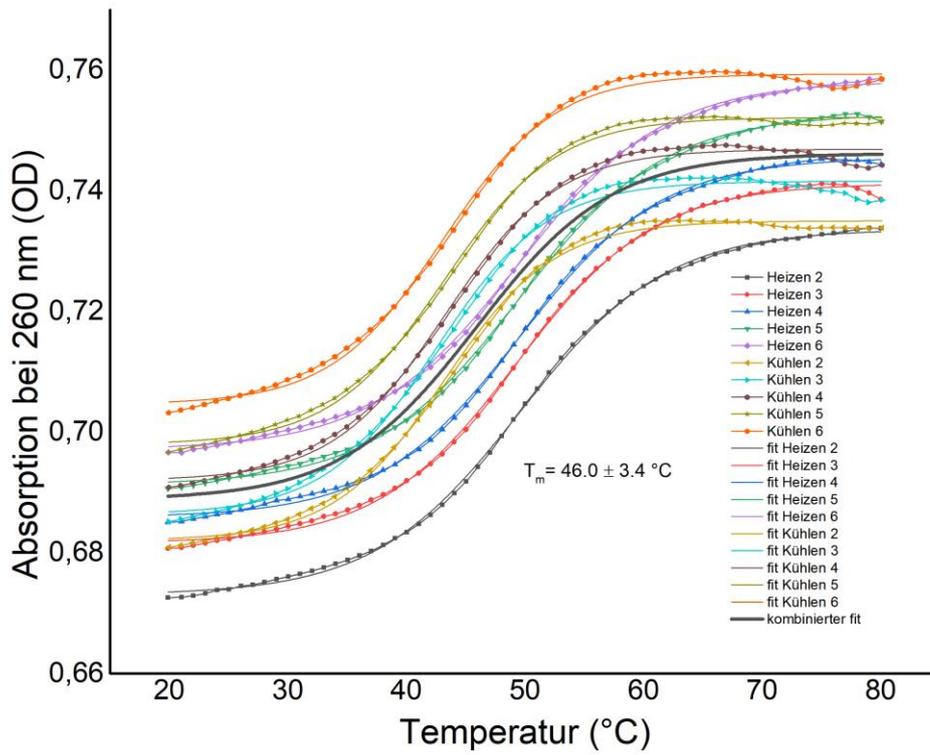


Abbildung 137: **Oben:** Schmelzkurven von RNA XII. **Unten:** Schmelzkurven von RNA XII mit Neomycin B.

5 Literatur

- (1) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Gatto, G. J.; Stryer, L. *Stryer Biochemie*, 8. Auflage; Springer eBook Collection; Springer Spektrum, 2018.
- (2) Campbell, N. A.; Markl, J. *Biologie: Aus d. Engl, 2.*, korrigierter Nachdr; Spektrum-Lehrbuch; Spektrum Akad. Verl.; Oxford, 1997.
- (3) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (4) Zaug, A. J.; Cech, T. R. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor in nuclei of tetrahymena. *Cell* **1980**, *19* (2), 331–338.
- (5) Jayasena, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* **1999**, *45* (9), 1628–1650.
- (6) Wang, J.; Wang, L.; Liu, X.; Liang, Z.; Song, S.; Li, W.; Li, G.; Fan, C. A Gold Nanoparticle-Based Aptamer Target Binding Readout for ATP Assay. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (22), 3943–3946.
- (7) Hofmann, H. P.; Limmer, S.; Hornung, V.; Sprinzl, M. Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA* **1997**, *3* (11), 1289–1300.
- (8) Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)* **1994**, *263* (5152), 1425–1429.
- (9) Burgstaller, P.; Famulok, M. Isolierung von RNA-Aptameren für biologische Cofaktoren durch In-vitro-Selektion. *Angew. Chem.* **1994**, *106* (10), 1163–1166.
- (10) Famulok, M.; Szostak, J. W. Stereospecific recognition of tryptophan agarose by in vitro selected RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (10), 3990–3991.
- (11) Lato, S. M.; Boles, A. R.; Ellington, A. D. In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chemistry & Biology* **1995**, *2* (5), 291–303.
- (12) Kim, S. J.; Kim, M. Y.; Lee, J. H.; You, J. C.; Jeong, S. Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *291* (4), 925–931.
- (13) Shangguan, D.; Li, Y.; Tang, Z.; Cao, Z. C.; Chen, H. W.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Yang, C. J.; Tan, W. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (32), 11838–11843.

- (14) Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annual Review of Medicine* **2005**, *56* (1), 555–583.
- (15) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering* **2007**, *24* (4), 381–403.
- (16) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (17) Zheng, C. Y.; Pestilli, F.; Rokem, A. Deconvolution of High Dimensional Mixtures via Boosting, with Application to Diffusion-Weighted MRI of Human Brain. *Advances in neural information processing systems* **2014**, *27*, 2699–2707.
- (18) Bruno, J. G.; Carrillo, M. P.; Phillips, T.; Andrews, C. J. A novel screening method for competitive FRET-aptamers applied to E. coli assay development. *J Fluoresc* **2010**, *20* (6), 1211–1223.
- (19) Bruno, J. G.; Phillips, T.; Carrillo, M. P.; Crowell, R. Plastic-adherent DNA aptamer-magnetic bead and quantum dot sandwich assay for *Campylobacter* detection. *J Fluoresc* **2009**, *19* (3), 427–435.
- (20) Mishra, G. K.; Sharma, V.; Mishra, R. K. Electrochemical Aptasensors for Food and Environmental Safeguarding: A Review. *Biosensors* **2018**, *8* (2), 28.
- (21) Zeng, G.; Zhang, C.; Huang, D.; Lai, C.; Tang, L.; Zhou, Y.; Xu, P.; Wang, H.; Qin, L.; Cheng, M. Practical and regenerable electrochemical aptasensor based on nanoporous gold and thymine-Hg²⁺-thymine base pairs for Hg²⁺ detection. *Biosensors & bioelectronics* **2017**, *90*, 542–548.
- (22) Iwagawa, T.; Ohuchi, S. P.; Watanabe, S.; Nakamura, Y. Selection of RNA aptamers against mouse embryonic stem cells. *Biochimie* **2012**, *94* (1), 250–257.
- (23) Zhou, W.; Huang, P.-J. J.; Ding, J.; Liu, J. Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *Analyst* **2014**, *139* (11), 2627–2640.
- (24) Zhang, W.; Liu, Q. X.; Guo, Z. H.; Lin, J. S. Practical Application of Aptamer-Based Biosensors in Detection of Low Molecular Weight Pollutants in Water Sources. *Molecules* **2018**, *23* (2), 344.
- (25) Hoellenriegel, J.; Zboralski, D.; Maasch, C.; Rosin, N. Y.; Wierda, W. G.; Keating, M. J.; Kruschinski, A.; Burger, J. A. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood* **2014**, *123* (7), 1032–1039.
- (26) Ismail, S. I.; Alshaer, W. Therapeutic aptamers in discovery, preclinical and clinical stages. *Advanced drug delivery reviews* **2018**, *134*, 51–64.

- (27) Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **1982**, *31* (1), 147–157.
- (28) Hutchins, C. J.; Rathjen, P. D.; Forster, A. C.; Symons, R. H. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic acids research* **1986**, *14* (9), 3627–3640.
- (29) Prody, G. A.; Bakos, J. T.; Buzayan, J. M.; Schneider, I. R.; Bruening, G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science (New York, N.Y.)* **1986**, *231* (4745), 1577–1580.
- (30) Weinberg, Z.; Kim, P. B.; Chen, T. H.; Li, S.; Harris, K. A.; Lünse, C. E.; Breaker, R. R. New classes of self-cleaving ribozymes revealed by comparative genomics analysis. *Nature chemical biology* **2015**, *11* (8), 606–610.
- (31) Feldstein, P. A.; Buzayan, J. M.; Bruening, G. Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene* **1989**, *82* (1), 53–61.
- (32) Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science (New York, N.Y.)* **2000**, *289* (5481), 920–930.
- (33) Hampel, A.; Cowan, J. A. A unique mechanism for RNA catalysis: the role of metal cofactors in hairpin ribozyme cleavage. *Chemistry & Biology* **1997**, *4* (7), 513–517.
- (34) Hegg, L. A.; Fedor, M. J. Kinetics and thermodynamics of intermolecular catalysis by hairpin ribozymes. *Biochemistry* **1995**, *34* (48), 15813–15828.
- (35) Hertel, K. J.; Herschlag, D.; Uhlenbeck, O. C. A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **1994**, *33* (11), 3374–3385.
- (36) Lihanova, Y.; Weinberg, C. E. Biochemical analysis of cleavage and ligation activities of the pistol ribozyme from *Paenibacillus polymyxa*. *RNA Biology* **2021**, *18* (11), 1858–1866.
- (37) Doherty, E. A.; Doudna, J. A. Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69* (1), 597–615.
- (38) Cech, T. R. Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59* (1), 543–568.
- (39) Breaker, R. R.; Joyce, G. F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chemistry & Biology* **1994**, *1* (4), 223–229.
- (40) Micura, R.; Höbartner, C. Fundamental studies of functional nucleic acids: aptamers, riboswitches, ribozymes and DNAzymes. *Chemical Society reviews* **2020**, *49* (20), 7331–7353.
- (41) Fokina, A. A.; Stetsenko, D. A.; François, J.-C. DNA enzymes as potential therapeutics: towards clinical application of 10-23 DNAzymes. *Expert opinion on biological therapy* **2015**, *15* (5), 689–711.

- (42) Ma, L.; Liu, J. Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology. *iScience* **2020**, *23* (1), 100815.
- (43) Reuter, J. S.; Mathews, D. H. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11* (1), 129.
- (44) Dowell, R. D.; Eddy, S. R. Evaluation of several lightweight stochastic context-free grammars for RNA secondary structure prediction. *BMC Bioinformatics* **2004**, *5* (1), 71.
- (45) Rivas, E. The four ingredients of single-sequence RNA secondary structure prediction. A unifying perspective. *RNA Biology* **2013**, *10* (7), 1185–1196.
- (46) Do, C. B.; Woods, D. A.; Batzoglou, S. CONTRAfold: RNA secondary structure prediction without physics-based models. *Bioinformatics* **2006**, *22* (14), e90–8.
- (47) Rivas, E. Evolutionary conservation of RNA sequence and structure. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **2021**, *12* (5), e1649.
- (48) Regulski, E. E.; Breaker, R. R. *In-line probing analysis of riboswitches*; Humana Press, 2008.
- (49) Tijerina, P.; Mohr, S.; Russell, R. DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes. *Nature protocols* **2007**, *2* (10), 2608–2623.
- (50) Wang, X.-W.; Liu, C.-X.; Chen, L.-L.; Zhang, Q. C. RNA structure probing uncovers RNA structure-dependent biological functions. *Nature chemical biology* **2021**, *17* (7), 755–766.
- (51) Zhao, J.; Qian, X.; Yeung, P. Y.; Zhang, Q. C.; Kwok, C. K. Mapping In Vivo RNA Structures and Interactions. *Trends in biochemical sciences* **2019**, *44* (6), 555–556.
- (52) Berman, H.; Henrick, K.; Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature structural biology* **2003**, *10* (12), 980.
- (53) Schmidt, A.; Teeter, M.; Weckert, E.; Lamzin, V. S. *Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution*, 2011. DOI: 10.2210/pdb3nir/pdb.
- (54) Hirano, Y.; Takeda, K.; Miki, K. Charge-density analysis of an iron-sulfur protein at an ultra-high resolution of 0.48 Å. *Nature* **2016**, *534* (7606), 281–284.
- (55) García-Nafria, J.; Tate, C. G. Structure determination of GPCRs: cryo-EM compared with X-ray crystallography. *Biochemical Society transactions* **2021**, *49* (5), 2345–2355.
- (56) Maveyraud, L.; Mourey, L. Protein X-ray Crystallography and Drug Discovery. *Molecules* **2020**, *25* (5).
- (57) McPherson, A. Introduction to protein crystallization. *Methods (San Diego, Calif.)* **2004**, *34* (3), 254–265.

- (58) Sierra, R. G.; Laksmono, H.; Kern, J.; Tran, R.; Hattne, J.; Alonso-Mori, R.; Lassalle-Kaiser, B.; Glöckner, C.; Hellmich, J.; Schafer, D. W.; Echols, N.; Gildea, R. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Sellberg, J.; McQueen, T. A.; Fry, A. R.; Messerschmidt, M. M.; Miahnahri, A.; Seibert, M. M.; Hampton, C. Y.; Starodub, D.; Loh, N. D.; Sokaras, D.; Weng, T.-C.; Zwart, P. H.; Glatzel, P.; Milathianaki, D.; White, W. E.; Adams, P. D.; Williams, G. J.; Boutet, S.; Zouni, A.; Messinger, J.; Sauter, N. K.; Bergmann, U.; Yano, J.; Yachandra, V. K.; Bogan, M. J. Nanoflow electrospinning serial femtosecond crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2012**, *68* (Pt 11), 1584–1587.
- (59) Huang, N.; Deng, H.; Liu, B.; Wang, D.; Zhao, Z. Features and futures of X-ray free-electron lasers. *Innovation (Cambridge (Mass.))* **2021**, *2* (2), 100097.
- (60) Broft, P.; Dzatko, S.; Krafcikova, M.; Wacker, A.; Hänsel-Hertsch, R.; Dötsch, V.; Trantirek, L.; Schwalbe, H. In-Cell NMR Spectroscopy of Functional Riboswitch Aptamers in Eukaryotic Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2021**, *60* (2), 865–872.
- (61) Luchinat, E.; Barbieri, L.; Cremonini, M.; Banci, L. Protein in-cell NMR spectroscopy at 1.2 GHz. *Journal of biomolecular NMR* **2021**, *75* (2-3), 97–107.
- (62) Kato, T.; Makino, F.; Nakane, T.; Terahara, N.; Kaneko, T.; Shimizu, Y.; Motoki, S.; Ishikawa, I.; Yonekura, K.; Namba, K. CryoTEM with a Cold Field Emission Gun That Moves Structural Biology into a New Stage. *Microsc Microanal* **2019**, *25* (S2), 998–999.
- (63) Wang, H.-W.; Wang, J.-W. How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2017**, *26* (1), 32–39.
- (64) Guaita, M.; Watters, S. C.; Loerch, S. Recent advances and current trends in cryo-electron microscopy. *Current opinion in structural biology* **2022**, *77*, 102484.
- (65) Berriman, J.; Unwin, N. Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets. *Ultramicroscopy* **1994**, *56* (4), 241–252.
- (66) Lu, Z.; Shaikh, T. R.; Barnard, D.; Meng, X.; Mohamed, H.; Yassin, A.; Mannella, C. A.; Agrawal, R. K.; Lu, T.-M.; Wagenknecht, T. Monolithic microfluidic mixing-spraying devices for time-resolved cryo-electron microscopy. *Journal of structural biology* **2009**, *168* (3), 388–395.
- (67) Unwin, N.; Fujiyoshi, Y. Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing. *Journal of Molecular Biology* **2012**, *422* (5), 617–634.
- (68) König, I.; Zarrine-Afsar, A.; Aznauryan, M.; Soranno, A.; Wunderlich, B.; Dingfelder, F.; Stüber, J. C.; Plückthun, A.; Nettels, D.; Schuler, B. Single-molecule spectroscopy of protein conformational dynamics in live eukaryotic cells. *Nature methods* **2015**, *12* (8), 773–779.

- (69) Sustarsic, M.; Kapanidis, A. N. Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells. *Current opinion in structural biology* **2015**, *34*, 52–59.
- (70) Bood, M.; Sarangamath, S.; Wranne, M. S.; Grøtli, M.; Wilhelmsson, L. M. Fluorescent nucleobase analogues for base-base FRET in nucleic acids: synthesis, photophysics and applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 114–129.
- (71) Bood, M.; Sarangamath, S.; Wranne, M. S.; Grøtli, M.; Wilhelmsson, L. M. Fluorescent nucleobase analogues for base-base FRET in nucleic acids: synthesis, photophysics and applications. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 114–129.
- (72) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy (3rd ed)*, 3rd ed.; Springer, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- (73) Börjesson, K.; Preus, S.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M. Nucleic acid base analog FRET-pair facilitating detailed structural measurements in nucleic acid containing systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (12), 4288–4293.
- (74) Kato, T.; Kashida, H.; Kishida, H.; Yada, H.; Okamoto, H.; Asanuma, H. Development of a robust model system of FRET using base surrogates tethering fluorophores for strict control of their position and orientation within DNA duplex. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (2), 741–750.
- (75) Klare, J. P.; Steinhoff, H.-J. Spin labeling EPR. *Photosynthesis research* **2009**, *102* (2-3), 377–390.
- (76) Klose, D.; Voskoboinikova, N.; Orban-Glass, I.; Rickert, C.; Engelhard, M.; Klare, J. P.; Steinhoff, H.-J. Light-induced switching of HAMP domain conformation and dynamics revealed by time-resolved EPR spectroscopy. *FEBS letters* **2014**, *588* (21), 3970–3976.
- (77) Hubbell, W. L.; Gross, A.; Langen, R.; Lietzow, M. A. Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Current opinion in structural biology* **1998**, *8* (5), 649–656.
- (78) Jeschke, G. The contribution of modern EPR to structural biology. *Emerging topics in life sciences* **2018**, *2* (1), 9–18.
- (79) Roessler, M. M.; Salvadori, E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences. *Chemical Society reviews* **2018**, *47* (8), 2534–2553.
- (80) Gunnar Jeschke. *Einführung in die ESR-Spektroskopie*, 2006.
- (81) Torricella, F.; Pierro, A.; Mileo, E.; Belle, V.; Bonucci, A. Nitroxide spin labels and EPR spectroscopy: A powerful association for protein dynamics studies. *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics* **2021**, *1869* (7), 140653.

- (82) Clark, A.; Sedhom, J.; Elajaili, H.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Dependence of electron paramagnetic resonance spectral lineshapes on molecular tumbling: Nitroxide radical in water:glycerol mixtures. *Concepts Magn Reson Part A* **2016**, *45A* (5), e21423.
- (83) Steinhoff, H. J. A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range. *Journal of biochemical and biophysical methods* **1988**, *17* (4), 237–247.
- (84) Jakobsen, U.; Shelke, S. A.; Vogel, S.; Sigurdsson, S. T. Site-directed spin-labeling of nucleic acids by click chemistry: detection of abasic sites in duplex DNA by EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (30), 10424–10428.
- (85) Lhomme, J.; Constant, J.-F.; Demeunynck, M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* **1999**, *52* (2), 65–83.
- (86) Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **1993**, *362* (6422), 709–715.
- (87) Edwards, T. E.; Okonogi, T. M.; Robinson, B. H.; Sigurdsson, S. T. Site-specific incorporation of nitroxide spin-labels into internal sites of the TAR RNA; structure-dependent dynamics of RNA by EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (7), 1527–1528.
- (88) Hubbell, W. L.; Altenbach, C. Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Current opinion in structural biology* **1994**, *4* (4), 566–573.
- (89) Jeschke, G.; Polyhach, Y. Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2007**, *9* (16), 1895–1910.
- (90) Rabenstein, M. D.; Shin, Y. K. Determination of the distance between two spin labels attached to a macromolecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92* (18), 8239–8243.
- (91) Jeschke, G. DEER distance measurements on proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63* (1), 419–446.
- (92) Schiemann, O.; Prisner, T. F. Long-range distance determinations in biomacromolecules by EPR spectroscopy. *Quart. Rev. Biophys.* **2007**, *40* (1), 1–53.
- (93) Halbmaier, K.; Seikowski, J.; Tkach, I.; Höbartner, C.; Sezer, D.; Bennati, M. High-resolution measurement of long-range distances in RNA: pulse EPR spectroscopy with TEMPO-labeled nucleotides. *Chemical science* **2016**, *7* (5), 3172–3180.

- (94) Endeward, B.; Hu, Y.; Bai, G.; Liu, G.; Prisner, T. F.; Fang, X. Long-range distance determination in fully deuterated RNA with pulsed EPR spectroscopy. *Biophysical Journal* **2022**, *121* (1), 37–43.
- (95) Schmidt, T.; Wälti, M. A.; Baber, J. L.; Hustedt, E. J.; Clore, G. M. Long Distance Measurements up to 160 Å in the GroEL Tetradecamer Using Q-Band DEER EPR Spectroscopy. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55* (51), 15905–15909.
- (96) Schiemann, O. Mapping global folds of oligonucleotides by pulsed electron-electron double resonance. *Methods in enzymology* **2009**, *469*, 329–351.
- (97) Jeschke, G.; Chechik, V.; Ionita, P.; Godt, A.; Zimmermann, H.; Banham, J.; Timmel, C. R.; Hilger, D.; Jung, H. DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data. *Appl. Magn. Reson.* **2006**, *30* (3-4), 473–498.
- (98) Milov, A. D., Salikhov, K. M., and Shchirov, M. D. Application of the double resonance method to electron spin echo in a study of the spatial distribution of paramagnetic centers in solids. *Soviet. Phys. Solid State* **1981**, *23*, 565–569.
- (99) Martin, R. E.; Pannier, M.; Diederich, F.; Gramlich, V.; Hubrich, M.; Spiess, H. W. Determination of End-to-End Distances in a Series of TEMPO Diradicals of up to 2.8 nm Length with a New Four-Pulse Double Electron Electron Resonance Experiment. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37* (20), 2833–2837.
- (100) Pannier, M.; Veit, S.; Godt, A.; Jeschke, G.; Spiess, H. W. Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2000**, *142* (2), 331–340.
- (101) Hemminga, M. A.; Berliner, L. J. *ESR spectroscopy in membrane biophysics*; Biological magnetic resonance, v. 27; Springer, 2007. DOI: 10.1007/978-0-387-49367-1.
- (102) Lindgren, M.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Jonsson, B.-H.; Hammarström, P.; Svensson, M.; Carlsson, U. Electron spin echo decay as a probe of aminoxyl environment in spin-labeled mutants of human carbonic anhydrase II †. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997** (12), 2549–2554.
- (103) Herzog, B.; Hahn, E. L. Transient Nuclear Induction and Double Nuclear Resonance in Solids. *Phys. Rev.* **1956**, *103* (1), 148–166.
- (104) ZECEVIC, A. N.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Lindgren, M. Dephasing of electron spin echoes for nitroxyl radicals in glassy solvents by non-methyl and methyl protons. *Molecular Physics* **1998**, *95* (6), 1255–1263.

- (105) Huber, M.; Lindgren, M.; Hammarström, P.; Mårtensson, L. G.; Carlsson, U.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Phase memory relaxation times of spin labels in human carbonic anhydrase II: pulsed EPR to determine spin label location. *Biophysical chemistry* **2001**, *94* (3), 245–256.
- (106) Schmidt, T.; Clore, G. M. Tm filtering by 1H-methyl labeling in a deuterated protein for pulsed double electron-electron resonance EPR. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2020**, *56* (74), 10890–10893.
- (107) Canarie, E. R.; Jahn, S. M.; Stoll, S. Quantitative Structure-Based Prediction of Electron Spin Decoherence in Organic Radicals. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2020**, *11* (9), 3396–3400.
- (108) El Mkami, H.; Ward, R.; Bowman, A.; Owen-Hughes, T.; Norman, D. G. The spatial effect of protein deuteration on nitroxide spin-label relaxation: implications for EPR distance measurement. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2014**, *248*, 36–41.
- (109) Huber, M.; Lindgren, M.; Hammarström, P.; Mårtensson, L. G.; Carlsson, U.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Phase memory relaxation times of spin labels in human carbonic anhydrase II: pulsed EPR to determine spin label location. *Biophysical chemistry* **2001**, *94* (3), 245–256.
- (110) Lindgren, M.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Jonsson, B.-H.; Hammarström, P.; Svensson, M.; Carlsson, U. Electron spin echo decay as a probe of aminoxyl environment in spin-labeled mutants of human carbonic anhydrase II †. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, *0* (12), 2549–2554.
- (111) Persson, M.; Harbridge, J. R.; Hammarström, P.; Mitri, R.; Mårtensson, L. G.; Carlsson, U.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Comparison of electron paramagnetic resonance methods to determine distances between spin labels on human carbonic anhydrase II. *Biophysical journal* **2001**, *80* (6), 2886–2897.
- (112) Gränz, M.; Erlenbach, N.; Spindler, P.; Gophane, D. B.; Stelzl, L. S.; Sigurdsson, S. T.; Prisner, T. F. Dynamics of Nucleic Acids at Room Temperature Revealed by Pulsed EPR Spectroscopy. *Angewandte Chemie* **2018**, *130* (33), 10700–10703.
- (113) Nakagawa, K.; Candelaria, M. B.; Chik, W. W.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R. Electron-spin relaxation times of chromium(V). *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1992**, *98* (1), 81–91.
- (114) Dzuba, S.; Maryasov, A.; Salikhov, K.; Tsvetkov, Y. Superslow rotations of nitroxide radicals studied by pulse EPR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1984**, *58* (1), 95–117.
- (115) Meyer, V.; Swanson, M. A.; Clouston, L. J.; Boratyński, P. J.; Stein, R. A.; Mchaourab, H. S.; Rajca, A.; Eaton, S. S.; Eaton, G. R. Room-temperature distance measurements of immobilized spin-labeled protein by DEER/PELDOR. *Biophysical journal* **2015**, *108* (5), 1213–1219.
- (116) Feintuch, A.; Otting, G.; Goldfarb, D. Gd³⁺ Spin Labeling for Measuring Distances in Biomacromolecules: Why and How? *Methods in enzymology* **2015**, *563*, 415–457.

- (117) Goldfarb, D. Gd³⁺ spin labeling for distance measurements by pulse EPR spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2014**, *16* (21), 9685–9699.
- (118) Raitsimring, A. M.; Gunanathan, C.; Potapov, A.; Efremenko, I.; Martin, J. M. L.; Milstein, D.; Goldfarb, D. Gd³⁺ complexes as potential spin labels for high field pulsed EPR distance measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (46), 14138–14139.
- (119) Cunningham, T. F.; Putterman, M. R.; Desai, A.; Horne, W. S.; Saxena, S. The double-histidine Cu²⁺-binding motif: a highly rigid, site-specific spin probe for electron spin resonance distance measurements. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (21), 6330–6334.
- (120) Sameach, H.; Ghosh, S.; Gevorkyan-Airapetov, L.; Saxena, S.; Ruthstein, S. EPR Spectroscopy Detects Various Active State Conformations of the Transcriptional Regulator CueR. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (10), 3053–3056.
- (121) Banerjee, D.; Yagi, H.; Huber, T.; Otting, G.; Goldfarb, D. Nanometer-Range Distance Measurement in a Protein Using Mn²⁺ Tags. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (2), 157–160.
- (122) Martorana, A.; Yang, Y.; Zhao, Y.; Li, Q.-F.; Su, X.-C.; Goldfarb, D. Mn(II) tags for DEER distance measurements in proteins via C-S attachment. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2015**, *44* (48), 20812–20816.
- (123) Abdullin, D.; Matsuoka, H.; Yulikov, M.; Fleck, N.; Klein, C.; Spicher, S.; Hagelueken, G.; Grimme, S.; Lützen, A.; Schiemann, O. Pulsed EPR Dipolar Spectroscopy under the Breakdown of the High-Field Approximation: The High-Spin Iron(III) Case. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2019**, *25* (37), 8820–8828.
- (124) Giannoulis, A.; Motion, C. L.; Oranges, M.; Bühl, M.; Smith, G. M.; Bode, B. E. Orientation selection in high-field RIDME and PELDOR experiments involving low-spin Coll ions. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2018**, *20* (4), 2151–2154.
- (125) Spindler, P. E.; Glaser, S. J.; Skinner, T. E.; Prisner, T. F. Broadband Inversion PELDOR Spectroscopy with Partially Adiabatic Shaped Pulses. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (12), 3509–3513.
- (126) Edwards, D. T.; Ma, Z.; Meade, T. J.; Goldfarb, D.; Han, S.; Sherwin, M. S. Extending the distance range accessed with continuous wave EPR with Gd³⁺ spin probes at high magnetic fields. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, *15* (27), 11313–11326.
- (127) Abdullin, D.; Schiemann, O. Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy and Metal Ions: Methodology and Biological Applications. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (2), 353–372.

- (128) Martorana, A.; Bellapadrona, G.; Feintuch, A.; Di Gregorio, E.; Aime, S.; Goldfarb, D. Probing protein conformation in cells by EPR distance measurements using Gd³⁺ spin labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (38), 13458–13465.
- (129) Qi, M.; Gross, A.; Jeschke, G.; Godt, A.; Drescher, M. Gd(III)-PyMTA label is suitable for in-cell EPR. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (43), 15366–15378.
- (130) Yang, Y.; Yang, F.; Gong, Y.-J.; Chen, J.-L.; Goldfarb, D.; Su, X.-C. A Reactive, Rigid Gd III Labeling Tag for In-Cell EPR Distance Measurements in Proteins. *Angew. Chem.* **2017**, *129* (11), 2960–2964.
- (131) Song, Y.; Meade, T. J.; Astashkin, A. V.; Klein, E. L.; Enemark, J. H.; Raitsimring, A. Pulsed dipolar spectroscopy distance measurements in biomacromolecules labeled with Gd(III) markers. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2011**, *210* (1), 59–68.
- (132) Abdelkader, E. H.; Feintuch, A.; Yao, X.; Adams, L. A.; Aurelio, L.; Graham, B.; Goldfarb, D.; Otting, G. Protein conformation by EPR spectroscopy using gadolinium tags clicked to genetically encoded p-azido-L-phenylalanine. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51* (88), 15898–15901.
- (133) Narr, E.; Godt, A.; Jeschke, G. Selective Measurements of a Nitroxide–Nitroxide Separation of 5 nm and a Nitroxide–Copper Separation of 2.5 nm in a Terpyridine-Based Copper(II) Complex by Pulse EPR Spectroscopy. *Angewandte Chemie* **2002**, *114* (20), 4063–4066.
- (134) Shenberger, Y.; Gevorkyan-Airapetov, L.; Hirsch, M.; Hofmann, L.; Ruthstein, S. *An in cell site-specific labeling methodology reveals conformational changes of proteins in bacteria*, 2022. DOI: 10.1101/2022.08.03.502720.
- (135) Fielding, A. J.; Fox, S.; Millhauser, G. L.; Chattopadhyay, M.; Kroneck, P. M. H.; Fritz, G.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Electron spin relaxation of copper(II) complexes in glassy solution between 10 and 120 K. *Journal of Magnetic Resonance* **2006**, *179* (1), 92–104.
- (136) Lovett, J. E.; Bowen, A. M.; Timmel, C. R.; Jones, M. W.; Dilworth, J. R.; Caprotti, D.; Bell, S. G.; Wong, L. L.; Harmer, J. Structural information from orientationally selective DEER spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2009**, *11* (31), 6840–6848.
- (137) Meyer, A.; Schiemann, O. PELDOR and RIDME Measurements on a High-Spin Manganese(II) Bisnitroxide Model Complex. *The journal of physical chemistry. A* **2016**, *120* (20), 3463–3472.
- (138) Donohue, M. P.; Szalai, V. A. Distance measurements between paramagnetic ligands bound to parallel stranded guanine quadruplexes. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2016**, *18* (22), 15447–15455.

- (139) Engelhard, D. M.; Meyer, A.; Berndhäuser, A.; Schiemann, O.; Clever, G. H. Di-copper(ii) DNA G-quadruplexes as EPR distance rulers. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2018**, *54* (54), 7455–7458.
- (140) Ghosh, S.; Lawless, M. J.; Brubaker, H. J.; Singewald, K.; Kurpiewski, M. R.; Jen-Jacobson, L.; Saxena, S. Cu²⁺-based distance measurements by pulsed EPR provide distance constraints for DNA backbone conformations in solution. *Nucleic acids research* **2020**, *48* (9), e49.
- (141) Lawless, M. J.; Ghosh, S.; Cunningham, T. F.; Shimshi, A.; Saxena, S. On the use of the Cu²⁺-iminodiacetic acid complex for double histidine based distance measurements by pulsed ESR. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2017**, *19* (31), 20959–20967.
- (142) Ghosh, S.; Lawless, M. J.; Rule, G. S.; Saxena, S. The Cu²⁺-nitrilotriacetic acid complex improves loading of α -helical double histidine site for precise distance measurements by pulsed ESR. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2018**, *286*, 163–171.
- (143) Stratmann, L. M.; Kutin, Y.; Kasanmascheff, M.; Clever, G. H. Precise Distance Measurements in DNA G-Quadruplex Dimers and Sandwich Complexes by Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (9), 4939–4947.
- (144) Krishna, M. C.; English, S.; Yamada, K.; Yoo, J.; Murugesan, R.; Devasahayam, N.; Cook, J. A.; Golman, K.; Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Subramanian, S.; Mitchell, J. B. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99* (4), 2216–2221.
- (145) Sven Andersson, Finn Radner, Anna Rydbeck, Rolf Servin, Lars-Goran Wistrand. Free radicals:US. 00553014.
- (146) Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen, Ib Leunbach. A method of determining oxygen concentration in a sample:WO. 97/09633.
- (147) Tormyshev, V. M.; Bagryanskaya, E. G. Trityl radicals: synthesis, properties, and applications. *Russ Chem Bull* **2021**, *70* (12), 2278–2297.
- (148) Kuzhelev, A. A.; Trukhin, D. V.; Krumkacheva, O. A.; Strizhakov, R. K.; Rogozhnikova, O. Y.; Troitskaya, T. I.; Fedin, M. V.; Tormyshev, V. M.; Bagryanskaya, E. G. Room-Temperature Electron Spin Relaxation of Triarylmethyl Radicals at the X- and Q-Bands. *The journal of physical chemistry. B* **2015**, *119* (43), 13630–13640.

- (149) Owenius, R.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S. Frequency (250 MHz to 9.2 GHz) and viscosity dependence of electron spin relaxation of triarylmethyl radicals at room temperature. *Journal of Magnetic Resonance* **2005**, *172* (1), 168–175.
- (150) Song, Y.; Liu, Y.; Hemann, C.; Villamena, F. A.; Zweier, J. L. Esterified dendritic TAM radicals with very high stability and enhanced oxygen sensitivity. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (4), 1371–1376.
- (151) Shevelev, G. Y.; Krumkacheva, O. A.; Lomzov, A. A.; Kuzhelev, A. A.; Rogozhnikova, O. Y.; Trukhin, D. V.; Troitskaya, T. I.; Tormyshev, V. M.; Fedin, M. V.; Pyshnyi, D. V.; Bagryanskaya, E. G. Physiological-temperature distance measurement in nucleic acid using triarylmethyl-based spin labels and pulsed dipolar EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9874–9877.
- (152) Poncelet, M.; Driesschaert, B.; Tseytlin, O.; Tseytlin, M.; Eubank, T. D.; Khramtsov, V. V. Dextran-conjugated tetrathiatriarylmethyl radicals as biocompatible spin probes for EPR spectroscopy and imaging. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2019**, *29* (14), 1756–1760.
- (153) Fleck, N.; Hett, T.; Brode, J.; Meyer, A.; Richert, S.; Schiemann, O. C-C Cross-Coupling Reactions of Trityl Radicals: Spin Density Delocalization, Exchange Coupling, and a Spin Label. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (6), 3293–3303.
- (154) Fleck, N.; Heubach, C. A.; Hett, T.; Haege, F. R.; Bawol, P. P.; Baltruschat, H.; Schiemann, O. SLIM: A Short-Linked, Highly Redox-Stable Trityl Label for High-Sensitivity In-Cell EPR Distance Measurements. *Angewandte Chemie* **2020**, *132* (24), 9854–9859.
- (155) Jassoy, J. J.; Berndhäuser, A.; Duthie, F.; Kühn, S. P.; Hagelueken, G.; Schiemann, O. Versatile Trityl Spin Labels for Nanometer Distance Measurements on Biomolecules In Vitro and within Cells. *Angewandte Chemie* **2017**, *129* (1), 183–187.
- (156) Keana, J. F.; Pou, S.; Rosen, G. M. Nitroxides as potential contrast enhancing agents for MRI application: influence of structure on the rate of reduction by rat hepatocytes, whole liver homogenate, subcellular fractions, and ascorbate. *Magnetic resonance in medicine* **1987**, *5* (6), 525–536.
- (157) Keana, J. F.; van Nice, F. L. Influence of structure on the reduction of nitroxide MRI contrast-enhancing agents by ascorbate. *Physiological chemistry and physics and medical NMR* **1984**, *16* (6), 477–480.
- (158) Paletta, J. T.; Pink, M.; Foley, B.; Rajca, S.; Rajca, A. Synthesis and reduction kinetics of sterically shielded pyrrolidine nitroxides. *Organic letters* **2012**, *14* (20), 5322–5325.

- (159) Bowman, D. F.; Gillan, T.; Ingold, K. U. Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. III. Self-reactions of dialkyl nitroxide radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (24), 6555–6561.
- (160) Nilsen, A.; Braslau, R. Nitroxide decomposition: Implications toward nitroxide design for applications in living free-radical polymerization. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2006**, *44* (2), 697–717.
- (161) Hyodo, F.; Matsumoto, K.-I.; Matsumoto, A.; Mitchell, J. B.; Krishna, M. C. Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer research* **2006**, *66* (20), 9921–9928.
- (162) Jagtap, A. P.; Krstic, I.; Kunjir, N. C.; Hänsel, R.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: analysis of stability in reducing environment. *Free radical research* **2015**, *49* (1), 78–85.
- (163) Haugland, M. M.; Lovett, J. E.; Anderson, E. A. Advances in the synthesis of nitroxide radicals for use in biomolecule spin labelling. *Chemical Society reviews* **2018**, *47* (3), 668–680.
- (164) Huang, S.; Paletta, J. T.; Elajaili, H.; Huber, K.; Pink, M.; Rajca, S.; Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Rajca, A. Synthesis and Electron Spin Relaxation of Tetracarboxylate Pyrroline Nitroxides. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (3), 1538–1544.
- (165) Nakatani, K.; Tor, Y., Eds. *Modified Nucleic Acids*, 1st ed. 2016; Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 31; Springer International Publishing, 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-27111-8.
- (166) Sajid, M.; Jeschke, G.; Wiebcke, M.; Godt, A. Conformationally unambiguous spin labeling for distance measurements. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2009**, *15* (47), 12960–12962.
- (167) Gophane, D. B.; Sigurdsson, S. T. Hydrogen-bonding controlled rigidity of an isoindoline-derived nitroxide spin label for nucleic acids. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49* (10), 999–1001.
- (168) Gophane, D. B.; Endeward, B.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. A semi-rigid isoindoline-derived nitroxide spin label for RNA. *Organic & biomolecular chemistry* **2018**, *16* (5), 816–824.
- (169) Stoller, S.; Sicoli, G.; Baranova, T. Y.; Bennati, M.; Diederichsen, U. TOPP: a novel nitroxide-labeled amino acid for EPR distance measurements. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (41), 9743–9746.
- (170) Miller, T. R.; Alley, S. C.; Reese, A. W.; Solomon, M. S.; McCallister, W. V.; Mailer, C.; Robinson, B. H.; Hopkins, P. B. A Probe for Sequence-Dependent Nucleic Acid Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (36), 9377–9378.

(171) Miller, T. R.; Hopkins, P. B. Toward the synthesis of a second-generation nitroxide spin probe for DNA dynamics studies. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **1994**, *4* (8), 981–986.

(172) Barhate, N.; Cekan, P.; Massey, A. P.; Sigurdsson, S. T. A nucleoside that contains a rigid nitroxide spin label: a fluorophore in disguise. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (15), 2655–2658.

(173) Cekan, P.; Smith, A. L.; Barhate, N.; Robinson, B. H.; Sigurdsson, S. T. Rigid spin-labeled nucleoside C: a nonperturbing EPR probe of nucleic acid conformation. *Nucleic acids research* **2008**, *36* (18), 5946–5954.

(174) Höbartner, C.; Sicoli, G.; Wachowius, F.; Gophane, D. B.; Sigurdsson, S. T. Synthesis and characterization of RNA containing a rigid and nonperturbing cytidine-derived spin label. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (17), 7749–7754.

(175) Juliusson, H. Y.; Sigurdsson, S. T. Reduction Resistant and Rigid Nitroxide Spin-Labels for DNA and RNA. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (6), 4036–4046.

(176) Schiemann, O.; Cekan, P.; Margraf, D.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Relative orientation of rigid nitroxides by PELDOR: beyond distance measurements in nucleic acids. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (18), 3292–3295.

(177) Bartels, A. Rigid spin labels for purine nucleosides in RNA and DNA. Dissertation, Göttingen.

(178) Ehrenberger, M. A.; Vieyra, A.; Esquiaqui, J. M.; Fanucci, G. E. Ion-dependent mobility effects of the *Fusobacterium nucleatum* glycine riboswitch aptamer II via site-directed spin-labeling (SDSL) electron paramagnetic resonance (EPR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2019**, *516* (3), 839–844.

(179) Cai, Q.; Kusnetzow, A. K.; Hubbell, W. L.; Haworth, I. S.; Gacho, G. P. C.; van Eps, N.; Hideg, K.; Chambers, E. J.; Qin, P. Z. Site-directed spin labeling measurements of nanometer distances in nucleic acids using a sequence-independent nitroxide probe. *Nucleic acids research* **2006**, *34* (17), 4722–4730.

(180) Qin, P. Z.; Butcher, S. E.; Feigon, J.; Hubbell, W. L. Quantitative analysis of the isolated GAAA tetraloop/receptor interaction in solution: a site-directed spin labeling study. *Biochemistry* **2001**, *40* (23), 6929–6936.

(181) Vicino, M. F.; Hett, T.; Schiemann, O. Spin Labeling of RNA Using "Click" Chemistry for Coarse-grained Structure Determination via Pulsed Electron-electron Double Resonance Spectroscopy. *Bio-protocol* **2021**, *11* (9), e4004.

- (182) Kerzhner, M.; Abdullin, D.; Więcek, J.; Matsuoka, H.; Hagelueken, G.; Schiemann, O.; Famulok, M. Post-synthetic Spin-Labeling of RNA through Click Chemistry for PELDOR Measurements. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2016**, *22* (34), 12113–12121.
- (183) Schiemann, O.; Weber, A.; Edwards, T. E.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Nanometer distance measurements on RNA using PELDOR. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (12), 3434–3435.
- (184) Edwards, T. E.; Sigurdsson, S. T. Site-specific incorporation of nitroxide spin-labels into 2'-positions of nucleic acids. *Nature protocols* **2007**, *2* (8), 1954–1962.
- (185) Büttner, L.; Javadi-Zarnaghi, F.; Höbartner, C. Site-specific labeling of RNA at internal ribose hydroxyl groups: terbium-assisted deoxyribozymes at work. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (22), 8131–8137.
- (186) Hara, H.; Horiuchi, T.; Saneyoshi, M.; Nishimura, S. 4-Thiouridine-specific spin-labeling of E. coli transfer RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1970**, *38* (2), 305–311.
- (187) Sicoli, G.; Wachowius, F.; Bennati, M.; Höbartner, C. Probing secondary structures of spin-labeled RNA by pulsed EPR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (36), 6443–6447.
- (188) Klare, J. P. Site-directed spin labeling EPR spectroscopy in protein research. *Biological chemistry* **2013**, *394* (10), 1281–1300.
- (189) Ramos, A.; Varani, G. A New Method To Detect Long-Range Protein–RNA Contacts: NMR Detection of Electron–Proton Relaxation Induced by Nitroxide Spin-Labeled RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (42), 10992–10993.
- (190) Borbat, P. P.; Davis, J. H.; Butcher, S. E.; Freed, J. H. Measurement of large distances in biomolecules using double-quantum filtered refocused electron spin-echoes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 7746–7747.
- (191) Berliner, L. J.; Grunwald, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K. A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition. *Analytical biochemistry* **1982**, *119* (2), 450–455.
- (192) Qin, P. Z.; Hideg, K.; Feigon, J.; Hubbell, W. L. Monitoring RNA base structure and dynamics using site-directed spin labeling. *Biochemistry* **2003**, *42* (22), 6772–6783.
- (193) Khan, S. I.; Beilstein, A. E.; Sykora, M.; Smith, G. D.; Hu, X.; Grinstaff, M. W. Automated Solid-Phase DNA Synthesis and Photophysical Properties of Oligonucleotides Labeled at the 5'-Terminus with Ru(bpy) 3²⁺. *Inorg. Chem.* **1999**, *38* (17), 3922–3925.

- (194) Strube, T.; Schiemann, O.; MacMillan, F.; Prisner, T.; Engels, J. W. A new facile method for spin-labeling of oligonucleotides. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2001**, *20* (4-7), 1271–1274.
- (195) Piton, N.; Schiemann, O.; Mu, Y.; Stock, G.; Prisner, T.; Engels, J. W. Synthesis of spin-labeled RNAs for long range distance measurements by peldor. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2005**, *24* (5-7), 771–775.
- (196) MacMillan, A. M.; Verdine, G. L. Synthesis of functionally tethered oligodeoxynucleotides by the convertible nucleoside approach. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (24), 5931–5933.
- (197) Allerson, C. R.; Chen, S. L.; Verdine, G. L. A Chemical Method for Site-Specific Modification of RNA: The Convertible Nucleoside Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (32), 7423–7433.
- (198) Okamoto, A.; Inasaki, T.; Saito, I. Nitroxide-labeled guanine as an ESR spin probe for structural study of DNA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2004**, *14* (13), 3415–3418.
- (199) Budil, D. E.; Kolaczowski, S. V.; Perry, A.; Varaprasad, C.; Johnson, F.; Strauss, P. R. Dynamics and ordering in a spin-labeled oligonucleotide observed by 220 GHz electron paramagnetic resonance. *Biophysical journal* **2000**, *78* (1), 430–438.
- (200) Sicoli, G.; Mathis, G.; Aci-Sèche, S.; Saint-Pierre, C.; Boulard, Y.; Gasparutto, D.; Gambarelli, S. Lesion-induced DNA weak structural changes detected by pulsed EPR spectroscopy combined with site-directed spin labelling. *Nucleic acids research* **2009**, *37* (10), 3165–3176.
- (201) Makino, K.; Murakami, A.; Nagahara, S.; Nakatsuji, Y.; Takeuchi, T. A study on spin-labelled oligonucleotide synthesis and its electron spin resonance behavior in solution. *Free radical research communications* **1989**, *6* (5), 311–316.
- (202) Cai, Q.; Kusnetzow, A. K.; Hideg, K.; Price, E. A.; Haworth, I. S.; Qin, P. Z. Nanometer distance measurements in RNA using site-directed spin labeling. *Biophysical journal* **2007**, *93* (6), 2110–2117.
- (203) Qin, P. Z.; Haworth, I. S.; Cai, Q.; Kusnetzow, A. K.; Grant, G. P. G.; Price, E. A.; Sowa, G. Z.; Popova, A.; Herreros, B.; He, H. Measuring nanometer distances in nucleic acids using a sequence-independent nitroxide probe. *Nature protocols* **2007**, *2* (10), 2354–2365.
- (204) Nguyen, P. H.; Popova, A. M.; Hideg, K.; Qin, P. Z. A nucleotide-independent cyclic nitroxide label for monitoring segmental motions in nucleic acids. *BMC biophysics* **2015**, *8*, 6.
- (205) Kuznetsov, N. A.; Milov, A. D.; Koval, V. V.; Samoilova, R. I.; Grishin, Y. A.; Knorre, D. G.; Tsvetkov, Y. D.; Fedorova, O. S.; Dzuba, S. A. PELDOR study of conformations of double-spin-labeled single- and double-stranded DNA with non-nucleotide inserts. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2009**, *11* (31), 6826–6832.

- (206) Gish, G.; Eckstein, F. DNA and RNA sequence determination based on phosphorothioate chemistry. *Science (New York, N.Y.)* **1988**, *240* (4858), 1520–1522.
- (207) Kim, N.-K.; Murali, A.; DeRose, V. J. Separate metal requirements for loop interactions and catalysis in the extended hammerhead ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (41), 14134–14135.
- (208) Saha, S.; Jagtap, A. P.; Sigurdsson, S. T. Site-directed spin labeling of 2'-amino groups in RNA with isoindoline nitroxides that are resistant to reduction. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51* (66), 13142–13145.
- (209) Kim, N.-K.; Murali, A.; DeRose, V. J. A distance ruler for RNA using EPR and site-directed spin labeling. *Chemistry & Biology* **2004**, *11* (7), 939–948.
- (210) Flaender, M.; Sicoli, G.; Fontecave, T.; Mathis, G.; Saint-Pierre, C.; Boulard, Y.; Gambarelli, S.; Gasparutto, D. Site-specific insertion of nitroxide-spin labels into DNA probes by click chemistry for structural analyses by ELDOR spectroscopy. *Nucleic acids symposium series (2004)* **2008** (52), 147–148.
- (211) Hubbell, W. L.; López, C. J.; Altenbach, C.; Yang, Z. Technological advances in site-directed spin labeling of proteins. *Current opinion in structural biology* **2013**, *23* (5), 725–733.
- (212) Braun, T.; Drescher, M.; Summerer, D. Expanding the Genetic Code for Site-Directed Spin-Labeling. *International journal of molecular sciences* **2019**, *20* (2).
- (213) Fleissner, M. R.; Brustad, E. M.; Kálai, T.; Altenbach, C.; Cascio, D.; Peters, F. B.; Hideg, K.; Peuker, S.; Schultz, P. G.; Hubbell, W. L. Site-directed spin labeling of a genetically encoded unnatural amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (51), 21637–21642.
- (214) Widder, P.; Berner, F.; Summerer, D.; Drescher, M. Double Nitroxide Labeling by Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions with Noncanonical Amino Acids for Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *ACS chemical biology* **2019**, *14* (5), 839–844.
- (215) Chin, J. W.; Santoro, S. W.; Martin, A. B.; King, D. S.; Wang, L.; Schultz, P. G. Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (31), 9026–9027.
- (216) Nguyen, D. P.; Lusic, H.; Neumann, H.; Kapadnis, P. B.; Deiters, A.; Chin, J. W. Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (25), 8720–8721.
- (217) Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C.; Schultz, C.; Lemke, E. A. Genetically encoded copper-free click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (17), 3878–3881.

- (218) Schmidt, M. J.; Borbas, J.; Drescher, M.; Summerer, D. A genetically encoded spin label for electron paramagnetic resonance distance measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (4), 1238–1241.
- (219) Sproat, B.; Colonna, F.; Mullah, B.; Tsou, D.; Andrus, A.; Hampel, A.; Vinayak, R. An Efficient Method for the Isolation and Purification of Oligoribonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides* **1995**, *14* (1-2), 255–273.
- (220) Welz, R.; Müller, S. 5-(Benzylmercapto)-1 H -tetrazole as activator for 2'- O -TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43* (5), 795–797.
- (221) Sonveaux, E. Protecting groups in oligonucleotide synthesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1994**, *26*, 1–71.
- (222) McBride, L. J.; Kierzek, R.; Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. Nucleotide chemistry. 16. Amidine protecting groups for oligonucleotide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (8), 2040–2048.
- (223) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. The final deprotection step in oligonucleotide synthesis is reduced to a mild and rapid ammonia treatment by using labile base-protecting groups. *Nucleic acids research* **1987**, *15* (2), 397–416.
- (224) Zhu, Q.; Delaney, M. O.; Greenberg, M. M. Observation and elimination of N-acetylation of oligonucleotides prepared using fast-deprotecting phosphoramidites and ultra-mild deprotection. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2001**, *11* (9), 1105–1107.
- (225) Ogilvie, K. K.; Theriault, N.; Sadana, K. L. Synthesis of oligoribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (23), 7741–7743.
- (226) Usman, N.; Ogilvie, K. K.; Jiang, M. Y.; Cedergren, R. J. The automated chemical synthesis of long oligoribonucleotides using 2'-O-silylated ribonucleoside 3'-O-phosphoramidites on a controlled-pore glass support: synthesis of a 43-nucleotide sequence similar to the 3'-half molecule of an Escherichia coli formylmethionine tRNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (25), 7845–7854.
- (227) Pitsch, S.; Weiss, P. A.; Jenny, L.; Stutz, A.; Wu, X. Reliable Chemical Synthesis of Oligoribonucleotides (RNA) with 2'-O-[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl(2'-O-tom)-Protected Phosphoramidites. *HCA* **2001**, *84* (12), 3773–3795.
- (228) Pitsch, S.; Weiss, P. A.; Wu, X.; Ackermann, D.; Honegger, T. Fast and Reliable Automated Synthesis of RNA and Partially 2'-O- Protected Precursors ('Caged RNA') Based on Two Novel, Orthogonal 2'-O-Protecting Groups, Preliminary Communication. *HCA* **1999**, *82* (10), 1753–1761.
- (229) Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for

the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic acids research* **1984**, *12* (11), 4539–4557.

(230) Gannett, P. M.; Darian, E.; Powell, J.; Johnson, E. M.; Mundoma, C.; Greenbaum, N. L.; Ramsey, C. M.; Dalal, N. S.; Budil, D. E. Probing triplex formation by EPR spectroscopy using a newly synthesized spin label for oligonucleotides. *Nucleic acids research* **2002**, *30* (23), 5328–5337.

(231) ROZANTSEV, E. G.; SHOLLE, V. D. Synthesis and Reactions of Stable Nitroxyl Radicals II. Reactions 1. *Synthesis* **1971**, *1971* (08), 401–414.

(232) Piton, N.; Mu, Y.; Stock, G.; Prisner, T. F.; Schiemann, O.; Engels, J. W. Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination. *Nucleic acids research* **2007**, *35* (9), 3128–3143.

(233) Chalmers, B. A.; Morris, J. C.; Fairfull-Smith, K. E.; Grainger, R. S.; Bottle, S. E. A novel protecting group methodology for syntheses using nitroxides. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49* (88), 10382–10384.

(234) Dane, E. L.; Corzilius, B.; Rizzato, E.; Stocker, P.; Maly, T.; Smith, A. A.; Griffin, R. G.; Ouari, O.; Tordo, P.; Swager, T. M. Rigid orthogonal bis-TEMPO biradicals with improved solubility for dynamic nuclear polarization. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (4), 1789–1797.

(235) Fairfull-Smith, K. E.; Bottle, S. E. The Synthesis and Physical Properties of Novel Polyaromatic Profluorescent Isoindoline Nitroxide Probes. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (32), 5391–5400.

(236) Juliusson, H. Y.; Segler, A.-L. J.; Sigurdsson, S. T. Benzoyl-Protected Hydroxylamines for Improved Chemical Synthesis of Oligonucleotides Containing Nitroxide Spin Labels. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019* (23), 3799–3805.

(237) Büttner, L.; Seikowski, J.; Wawrzyniak, K.; Ochmann, A.; Höbartner, C. Synthesis of spin-labeled riboswitch RNAs using convertible nucleosides and DNA-catalyzed RNA ligation. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2013**, *21* (20), 6171–6180.

(238) Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünewald, C.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. Synthesis of a Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label for EPR Experiments with RNA. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (3), 491–496.

(239) Seven, I.; Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünewald, C.; Brüß, S.; Krstić, I.; Prisner, T. F.; Heckel, A.; Göbel, M. W. Photolabile Protecting Groups for Nitroxide Spin Labels. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (19), 4037–4043.

(240) Weinrich, T.; Jaumann, E. A.; Scheffer, U.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. A Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label: Synthesis of a Full-Length TAR RNA and Investigation by In-Line

Probing and EPR Spectroscopy. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2018**, *24* (23), 6202–6207.

(241) Weinrich, T.; Jaumann, E. A.; Scheffer, U. M.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. Phosphoramidite building blocks with protected nitroxides for the synthesis of spin-labeled DNA and RNA. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 1563–1569.

(242) Ramírez, F.; Bhardwaj, V.; Arrigoni, L.; Lam, K. C.; Grüning, B. A.; Villaveces, J.; Habermann, B.; Akhtar, A.; Manke, T. High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies. *Nature communications* **2018**, *9* (1), 189.

(243) Esquiaqui, J. M.; Sherman, E. M.; Ye, J.-D.; Fanucci, G. E. Conformational Flexibility and Dynamics of the Internal Loop and Helical Regions of the Kink-Turn Motif in the Glycine Riboswitch by Site-Directed Spin-Labeling. *Biochemistry* **2016**, *55* (31), 4295–4305.

(244) Obeid, S.; Yulikov, M.; Jeschke, G.; Marx, A. Enzymatic synthesis of multiple spin-labeled DNA. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (36), 6782–6785.

(245) Domnick, C.; Eggert, F.; Wuebben, C.; Bornewasser, L.; Hagelueken, G.; Schiemann, O.; Kath-Schorr, S. EPR Distance Measurements on Long Non-coding RNAs Empowered by Genetic Alphabet Expansion Transcription. *Angewandte Chemie* **2020**, *132* (20), 7965–7970.

(246) Kamble, N. R.; Gränz, M.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Noncovalent and site-directed spin labeling of duplex RNA. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2016**, *52* (100), 14442–14445.

(247) Saha, S.; Hetzke, T.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T. Noncovalent spin-labeling of RNA: the aptamer approach. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2018**, *54* (83), 11749–11752.

(248) TOM-PROTECTING-GROUP™-A MAJOR IMPROVEMENT IN RNA SYNTHESIS, 1998.

(249) Wu, H.; Coble, V.; Vasalatiy, O.; Swenson, R. E.; Krishna, M. C.; Mitchell, J. B. An efficient synthesis of 3-(N-piperidinemethyl)-2, 2, 5, 5-tetramethyl-1-oxy-3-pyrroline, a promising radioprotector for cancer radiotherapy. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (40), 5570–5571.

(250) Yong, P. K.; Banerjee, A. Photochemistry of 2-nitrobenzyl enol ethers: oxidative C=C bond scission. *Organic letters* **2005**, *7* (12), 2485–2487.

(251) Seven, I.; Weinrich, T.; Gränz, M.; Grünewald, C.; Brüß, S.; Krstić, I.; Prisner, T. F.; Heckel, A.; Göbel, M. W. Photolabile Protecting Groups for Nitroxide Spin Labels. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (19), 4037–4043.

- (252) Ahamad, S.; Gupta, A. K.; Kant, R.; Mohanan, K. Domino reaction involving the Bestmann-Ohira reagent and α,β -unsaturated aldehydes: efficient synthesis of functionalized pyrazoles. *Organic & biomolecular chemistry* **2015**, *13* (5), 1492–1499.
- (253) Schiemann, O.; Piton, N.; Plackmeyer, J.; Bode, B. E.; Prisner, T. F.; Engels, J. W. Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxide TPA and use of PELDOR, a pulse EPR method, to measure intramolecular distances. *Nature protocols* **2007**, *2* (4), 904–923.
- (254) Terrazas, M.; Kool, E. T. RNA major groove modifications improve siRNA stability and biological activity. *Nucleic acids research* **2009**, *37* (2), 346–353.
- (255) Kumar, R.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E. A mild and efficient methodology for the synthesis of 5-halogeno uracil nucleosides that occurs via a 5-halogeno-6-azido-5,6-dihydro intermediate. *Can. J. Chem.* **1994**, *72* (9), 2005–2010.
- (256) Weadge, J. T.; Palcic, M. M. Glycosyltransferases, Chemistry of.
- (257) Junichi Asakura, Morris J. Robins. Cerium(IV)-mediated halogenation at C-5 of uracil derivatives. *Journal of Organic Chemistry* **1990** (55), 4928–4933.
- (258) Ohgi, T.; Masutomi, Y.; Ishiyama, K.; Kitagawa, H.; Shiba, Y.; Yano, J. A new RNA synthetic method with a 2'-O-(2-cyanoethoxymethyl) protecting group. *Organic letters* **2005**, *7* (16), 3477–3480.
- (259) Shiba, Y.; Masuda, H.; Watanabe, N.; Ego, T.; Takagaki, K.; Ishiyama, K.; Ohgi, T.; Yano, J. Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate. *Nucleic acids research* **2007**, *35* (10), 3287–3296.
- (260) BENNETT, R. H. Chlorination Of Organic Sulfides With N-chlorosuccinimide. Dissertation, Vanderbilt, Nashville, 1969.
- (261) Zadeh, J. N.; Steenberg, C. D.; Bois, J. S.; Wolfe, B. R.; Pierce, M. B.; Khan, A. R.; Dirks, R. M.; Pierce, N. A. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems. *Journal of computational chemistry* **2011**, *32* (1), 170–173.
- (262) Krstić, I.; Frolow, O.; Sezer, D.; Endeward, B.; Weigand, J. E.; Suess, B.; Engels, J. W.; Prisner, T. F. PELDOR spectroscopy reveals preorganization of the neomycin-responsive riboswitch tertiary structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (5), 1454–1455.
- (263) Weigand, J. E.; Sanchez, M.; Gunnesch, E.-B.; Zeiher, S.; Schroeder, R.; Suess, B. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* **2008**, *14* (1), 89–97.

- (264) Duchardt-Ferner, E.; Weigand, J. E.; Ohlenschläger, O.; Schmidtke, S. R.; Suess, B.; Wöhnert, J. Hochmodulare Struktur und Ligandenbindung durch “Conformational Capture” in einem minimalistischen RNA-Schalter. *Angew. Chem.* **2010**, *122* (35), 6352–6355.
- (265) Klötzner, D.-P.; Klehs, K.; Heilemann, M.; Heckel, A. A new photoactivatable near-infrared-emitting QCy7 fluorophore for single-molecule super-resolution microscopy. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2017**, *53* (71), 9874–9877.
- (266) Schmidt, M. J.; Weber, A.; Pott, M.; Welte, W.; Summerer, D. Structural basis of furan-amino acid recognition by a polyspecific aminoacyl-tRNA-synthetase and its genetic encoding in human cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2014**, *15* (12), 1755–1760.
- (267) Schmidt, M. J.; Fedoseev, A.; Bücker, D.; Borbas, J.; Peter, C.; Drescher, M.; Summerer, D. EPR Distance Measurements in Native Proteins with Genetically Encoded Spin Labels. *ACS chemical biology* **2015**, *10* (12), 2764–2771.
- (268) Kucher, S.; Korneev, S.; Tyagi, S.; Apfelbaum, R.; Grohmann, D.; Lemke, E. A.; Klare, J. P.; Steinhoff, H.-J.; Klose, D. Orthogonal spin labeling using click chemistry for in vitro and in vivo applications. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2017**, *275*, 38–45.
- (269) Kálai, T.; Fleissner, M. R.; Jekő, J.; Hubbell, W. L.; Hideg, K. Synthesis of new spin labels for Cu-free click conjugation. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (21), 2747–2749.
- (270) Braun, T. S.; Widder, P.; Osswald, U.; Groß, L.; Williams, L.; Schmidt, M.; Helmle, I.; Summerer, D.; Drescher, M. Isoindoline-Based Nitroxides as Bioresistant Spin Labels for Protein Labeling through Cysteines and Alkyne-Bearing Noncanonical Amino Acids. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2020**, *21* (7), 958–962.
- (271) Widder, P.; Schuck, J.; Summerer, D.; Drescher, M. Combining site-directed spin labeling in vivo and in-cell EPR distance determination. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2020**, *22* (9), 4875–4879.
- (272) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A strain-promoted 3 + 2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047.
- (273) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688–3690.
- (274) Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11486–11493.

- (275) Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (12), 2253–2255.
- (276) Kornmayer, S.; Rominger, F.; Gleiter, R. Synthesis of 11,12-Didehydrodibenzo[a,e]cycloocten-5(6H)-one: A Strained Eight-Membered Alkyne. *Synthesis* **2009**, *2009* (15), 2547–2552.
- (277) Shukla, D.; Lukeman, M.; Shi, Y.; Wan, P. Excited state proton transfer to and from carbon: studies of enhanced excited state basicity of biphenyl derivatives and carbon acidity of dibenzosuberones. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2002**, *154* (1), 93–105.
- (278) Mbuja, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. Strain-promoted alkyne-azide cycloadditions (SPAAC) reveal new features of glycoconjugate biosynthesis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2011**, *12* (12), 1912–1921.
- (279) Kugele, A.; Braun, T. S.; Widder, P.; Williams, L.; Schmidt, M. J.; Summerer, D.; Drescher, M. Site-directed spin labelling of proteins by Suzuki-Miyaura coupling via a genetically encoded aryl iodide amino acid. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2019**, *55* (13), 1923–1926.
- (280) Kálai, T.; Schindler, J.; Balog, M.; Fogassy, E.; Hideg, K. Synthesis and resolution of new paramagnetic α -amino acids. *Tetrahedron* **2008**, *64* (6), 1094–1100.
- (281) Hashimoto, T.; Maruoka, K. Recent development and application of chiral phase-transfer catalysts. *Chemical reviews* **2007**, *107* (12), 5656–5682.
- (282) Ooi, T.; Maruoka, K. Fortschritte bei asymmetrischen Phasentransferkatalysen. *Angewandte Chemie* **2007**, *119* (23), 4300–4345.
- (283) Thomas, K.; Chalmers, B. A.; Fairfull-Smith, K. E.; Bottle, S. E. Approaches to the Synthesis of a Water-Soluble Carboxy Nitroxide. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (5), 853–857.
- (284) Combes, S.; Tran, K. T.; Ayhan, M. M.; Karoui, H.; Rockenbauer, A.; Tonetto, A.; Monnier, V.; Charles, L.; Rosas, R.; Viel, S.; Siri, D.; Tordo, P.; Clair, S.; Wang, R.; Bardelang, D.; Ouari, O. Triangular Regulation of Cucurbit[8]uril 1:1 Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (14), 5897–5907.
- (285) Mellem, K. T.; Myers, A. G. A simple, scalable synthetic route to (+)- and (-)-pseudoephedrine. *Organic letters* **2013**, *15* (21), 5594–5597.
- (286) Seiple, I. B.; Mercer, J. A. M.; Sussman, R. J.; Zhang, Z.; Myers, A. G. Stereocontrolled synthesis of syn- β -Hydroxy- α -amino acids by direct aldolization of pseudoephedrine glycinamide. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (18), 4642–4647.

- (287) Myers, A. G.; Gleason, J. L.; Yoon, T.; Kung, D. W. Highly Practical Methodology for the Synthesis of d - and l - α -Amino Acids, N -Protected α -Amino Acids, and N -Methyl- α -amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (4), 656–673.
- (288) Verena Ludwig. Dissertation, Universität Frankfurt, 2005.
- (289) Micallef, A. S.; Bott, R. C.; Bottle, S. E.; Smith, G.; White, J. M.; Matsuda, K.; Iwamura, H. Brominated isoindolines: precursors to functionalised nitroxides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999** (1), 65–72.
- (290) Debele, E. A. Synthesis and evaluation of resveratrolbased nitroxides as potential treatments for hypertension. Masterarbeit, Queensland University of Technology, Australia, 2013.
- (291) Nicolaou, K. C.; Murphy, F.; Barluenga, S.; Ohshima, T.; Wei, H.; Xu, J.; Gray, D. L. F.; Baudoin, O. Total Synthesis of the Novel Immunosuppressant Sanglifehrin A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (16), 3830–3838.
- (292) Huang, J.; Hong, M.; Wang, C.-C.; Kramer, S.; Lin, G.-Q.; Sun, X.-W. Asymmetric Synthesis of Chiral Spiroketal Bisphosphine Ligands and Their Application in Enantioselective Olefin Hydrogenation. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (20), 12838–12846.
- (293) Fox, M. E.; Jackson, M.; Meek, G.; Willets, M. Large-Scale Synthesis of a Substituted d - Phenylalanine Using Asymmetric Hydrogenation. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15* (5), 1163–1171.
- (294) Seebach, D.; Sting, A. R.; Hoffmann, M. Die Selbstregeneration von Stereozentren (SRS) — Anwendungen, Grenzen und Preisgabe eines Synthesepinzips. *Angewandte Chemie* **1996**, *108* (23-24), 2881–2921.
- (295) Dellaria, J. F.; Santarsiero, B. D. Enantioselective synthesis of α -amino acid derivatives via the stereoselective alkylation of a homochiral glycine enolate synthon. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (16), 3916–3926.
- (296) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179.
- (297) Budavari, S., Ed. *The MERCK Index: An Encyclopedial of Chemical, Drugs and Biologicals*, 11th ed.; Merck & Co, 1989.
- (298) Stork, S. W. Facile Synthesis of 3-Formyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-oxypyrroline. *Synthesis* **1999**, *8*, 1309–1312.

- (299) Weinrich, T.; Jaumann, E. A.; Scheffer, U.; Prisner, T. F.; Göbel, M. W. A Cytidine Phosphoramidite with Protected Nitroxide Spin Label: Synthesis of a Full-Length TAR RNA and Investigation by In-Line Probing and EPR Spectroscopy. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2018**, *24* (23), 6202–6207.
- (300) Hideg, K.; Hankovszky, H. O.; Lex, L.; Ku; csár, G. Nitroxyls; VI 1. Synthesis and Reactions of 3-Hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydropyrrole-1-oxyl and 3-Formyl Derivatives. *Synthesis* **1980**, *1980* (11), 911–914.
- (301) Corey, E. J.; Fuchs, P. L. A synthetic method for formyl→ethynyl conversion ($\text{RCHO} \rightarrow \text{RC} \equiv \text{CH}$ or $\text{RC} \equiv \text{CR}'$). *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (36), 3769–3772.
- (302) Rao, M. L. N.; Jadhav, D. N.; Dasgupta, P. Pd-catalyzed domino synthesis of internal alkynes using triaryl bismuths as multicoupling organometallic nucleophiles. *Organic letters* **2010**, *12* (9), 2048–2051.
- (303) Kálai, T. Synthesis and Reactions of a Symmetric Paramagnetic Pyrrolidine Diene. *Synthesis* **1999**, *1999* (06), 973–980.
- (304) Žemlička, J.; Smrt, J.; Šorm, F. Nucleic acid components and their analogues. XLVIII. Synthesis and structure of nitrogen mustard derivatives of cytidine and 6-azacytidine. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29* (3), 635–644.
- (305) Kumar, V.; Malhotra, S. V. Ionic liquid mediated synthesis of 5-halouracil nucleosides: key precursors for potential antiviral drugs. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2009**, *28* (9), 821–834.
- (306) Meneghesso, S.; Vanderlinden, E.; Stevaert, A.; McGuigan, C.; Balzarini, J.; Naesens, L. Synthesis and biological evaluation of pyrimidine nucleoside monophosphate prodrugs targeted against influenza virus. *Antiviral research* **2012**, *94* (1), 35–43.
- (307) Piton, N.; Mu, Y.; Stock, G.; Prisner, T. F.; Schiemann, O.; Engels, J. W. Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination. *Nucleic acids research* **2007**, *35* (9), 3128–3143.
- (308) Casadio, Y. S.; Brown, D. H.; Chirila, T. V.; Kraatz, H.-B.; Baker, M. V. Biodegradation of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) and poly{(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate} hydrogels containing peptide-based cross-linking agents. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (11), 2949–2959.
- (309) Chung, J.-Y.; Schulz, C.; Bauer, H.; Sun, Y.; Sitzmann, H.; Auerbach, H.; Pierik, A. J.; Schünemann, V.; Neuba, A.; Thiel, W. R. Cyclopentadienide Ligand Cp C– Possessing Intrinsic Helical Chirality and Its Ferrocene Analogues. *Organometallics* **2015**, *34* (22), 5374–5382.
- (310) Kornmayer, S.; Rominger, F.; Gleiter, R. Synthesis of 11,12-Didehydrodibenzo[a,e]cycloocten-5(6H)-one: A Strained Eight-Membered Alkyne. *Synthesis* **2009**, *2009* (15), 2547–2552.

- (311) Treibs, W.; Klinkhammer, H. J. Synthesis of 2,3,6,7-dibenzo-4-suberen-1-one and 2,3,6,7-dibenzo-4-suberene. *Chemische Berichte* **1951**, *84*, 671–679.
- (312) Rozantzev, E. G.; Krinitzkaya, L. A. Free iminoxyl radicals in the hydrogenated pyrrole series. *Tetrahedron* **1965**, *21* (2), 491–497.
- (313) Wu, X.; Ding, G.; Yang, L.; Lu, W.; Li, W.; Zhang, Z.; Xie, X. Alkoxide-Catalyzed Hydrosilylation of Cyclic Imides to Isoquinolines via Tandem Reduction and Rearrangement. *Organic letters* **2018**, *20* (18), 5610–5613.
- (314) Kormendy, I. K. The reactions of polyamines with phthalimidoalkyl halides. *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae* **1958** (17), 255–264.
- (315) Haugland, M. M.; El-Sagheer, A. H.; Porter, R. J.; Peña, J.; Brown, T.; Anderson, E. A.; Lovett, J. E. 2'-Alkynylnucleotides: A Sequence- and Spin Label-Flexible Strategy for EPR Spectroscopy in DNA. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (29), 9069–9072.
- (316) Griffiths, P. G.; Moad, G.; Rizzardo, E. Synthesis of the radical scavenger 1,1,3,3-Tetramethylisoindolin-2-yloxyl. *Aust. J. Chem.* **1983**, *36* (2), 397.
- (317) Griffiths, P. G.; Rizzardo, E.; Solomon, D. H. Quantitative studies on free radical reactions with the scavenger 1,1,3,3-tetramethylisoindolinyl-2-oxy. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23* (12), 1309–1312.
- (318) Kálai, T.; Jekő, J.; Hideg, K. Synthesis of Isoindoline Nitroxides by Electrocyclic Reactions. *Synthesis* **2009**, *2009* (15), 2591–2595.
- (319) Thomas, K.; Chalmers, B. A.; Fairfull-Smith, K. E.; Bottle, S. E. Approaches to the Synthesis of a Water-Soluble Carboxy Nitroxide. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (5), 853–857.
- (320) Combes, S.; Tran, K. T.; Ayhan, M. M.; Karoui, H.; Rockenbauer, A.; Tonetto, A.; Monnier, V.; Charles, L.; Rosas, R.; Viel, S.; Siri, D.; Tordo, P.; Clair, S.; Wang, R.; Bardelang, D.; Ouari, O. Triangular Regulation of Cucurbit[8]uril 1:1 Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141* (14), 5897–5907.
- (321) Lasch, R.; Heinrich, M. R. Cycloaddition reactions of glycine imine anions to phenylazocarboxylic esters – a new access to 1,3,5-trisubstituted 1,2,4-triazoles. *Tetrahedron* **2015**, *71* (25), 4282–4295.
- (322) Ooi, T.; Arimura, Y.; Hiraiwa, Y.; Yuan, L. M.; Kano, T.; Inoue, T.; Matsumoto, J.; Maruoka, K. Highly enantioselective monoalkylation of p-chlorobenzaldehyde imine of glycine tert-butyl ester under mild phase-transfer conditions. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (4), 603–606.
- (323) Verena Ludwig. Dissertation, Goethe Universität, Frankfurt, 2005.

(324) Jackson, R. F. W.; Wishart, N.; Wood, A.; James, K.; Wythes, M. J. Preparation of enantiomerically pure protected 4-oxo- α -amino acids and 3-aryl- α -amino acids from serine. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (12), 3397–3404.

(325) Ross, A. J.; Lang, H. L.; Jackson, R. F. W. Much improved conditions for the Negishi cross-coupling of iodoalanine derived zinc reagents with aryl halides. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (1), 245–248.

(326) Cantor, C. R.; Tinoco, I. Absorption and Optical Rotatory Dispersion of Seven Trinucleoside Diphosphates. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13* (1), 65–77.

(327) Worswick, S. G.; Spencer, J. A.; Jeschke, G.; Kuprov, I. Deep neural network processing of DEER data. *Science advances* **2018**, *4* (8), eaat5218.

6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Struktur der Nukleotide.	1
<i>Abbildung 2:</i> Prinzip der Funktionsweise eines Aptamers.	2
<i>Abbildung 3:</i> Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses.	3
<i>Abbildung 4:</i> Übersicht der bisher entdeckten Ribozymgruppen.	4
<i>Abbildung 5:</i> Verschiedene Reagenzien für das chemical probing und die entsprechenden Reaktionspartner/orte.	6
<i>Abbildung 6:</i> Prinzip des Crosslinking.	6
<i>Abbildung 7:</i> Relativer Anteil an gelösten Strukturen für Elektronenmikroskopie, NMR und Röntgenstrukturanalyse.	7
<i>Abbildung 8:</i> Auswahl fluoreszenter Nukleobasen, die beim base-base FRET eingesetzt werden.	8
<i>Abbildung 9:</i> Die Elektronen-Zeeman Aufspaltung in einem Magnetfeld B_0	10
<i>Abbildung 10:</i> Energieschema und cw-Spektrum eines Nitroxids mit Elektronenspin $s = \frac{1}{2}$ und $l = 1$ bei einem angelegten Magnetfeld B_0	11
<i>Abbildung 11:</i> Simulierte cw-Spektren zur Veranschaulichung der Dynamik von Nitroxidspinlabel... ..	12
<i>Abbildung 12:</i> EPR-Spektren eines spinmarkierten Nukleosids, einer ssDNA und eines DNA-Duplexes, in welchem das spinmarkierte Nukleosid einmal einem A und einmal einem Pentosering gegenüber liegt.	13
<i>Abbildung 13:</i> A: Sequenz der untersuchten TAR RNA. B: EPR-Spektren der gelabelten TAR RNA.	14
<i>Abbildung 14:</i> A: Schema der Dipol-Dipol-Kupplung zweier Spinlabel. B: Pake Pattern einer isotropen Orientierung des Abstandsvektors r_{AB}	15
<i>Abbildung 15:</i> Pulssequenz eines Vier-Puls-PELDOR-Experiments.	16
<i>Abbildung 16:</i> Vier-Puls-PELDOR Vektordiagramme mit $\omega_{ee} = +\frac{1}{2}$ und $\tau_1 = \tau_2$	17
<i>Abbildung 17:</i> Spin-Echo-Kurven für unterschiedlich stark deuterierte AviTag-Proteine für unterschiedliche Spinpositionen mit entsprechenden Kristallstrukturen.	18
<i>Abbildung 18:</i> Links: Struktur des an Nucleosil gebundenen DNA-Duplex. Rechts: Time trace der PELDOR-Messung bei verschiedenen Frequenzoffsets.	19
<i>Abbildung 19:</i> Abstandsverteilungen bei 80 K (schwarz) und 160 K (grau) für unterschiedliche Spinlabelpositionen.	20
<i>Abbildung 20:</i> Chelatkomplexe die zur Abstandsmessung mittels Gd(III)-Ionen dienen.	22
<i>Abbildung 21:</i> Chelatkomplexe die zur Abstandsbestimmung mit Cu(II)-Ionen verwendet werden. .	23

<i>Abbildung 22:</i> Strukturen des Finlandrdikals (links) und des OX063 (rechts) mit unterschiedlichen Linkervarianten.....	25
<i>Abbildung 23:</i> Einfluss von Ringgröße, α -Kohlenstoffsubstituenten und Ringstruktur auf die Stabilität und T_m von Nitroxidradikalen.....	26
<i>Abbildung 24:</i> Strukturen der konformationell festgelgeten Spinlabel ^{lm}U , ^{lm}Um , TOPP und ^{Exim}U	27
<i>Abbildung 25:</i> Beispielstrukturen für starre Spinlabel auf Basis von Cytidin, Adenosin und Quinolin.	28
<i>Abbildung 26:</i> Strukturen von Nitroxidreagenzien am Beispiel von TEMPO.	29
<i>Abbildung 27:</i> Strukturen unterschiedlich spinmarkierter Nukleotide.....	29
<i>Abbildung 28:</i> Synthese von spinmarkierter RNA unter Verwendung von wandelbaren Nukleotiden.	30
<i>Abbildung 29:</i> Spinlabel die an interne Phosphordiester bzw. terminale Phosphate gekuppelt sind..	31
<i>Abbildung 30:</i> Spinlabel, welche über die Zuckereinheit mit der Nukleinsäure verknüpft sind.....	31
<i>Abbildung 31:</i> Strukturen nichtkanonischer Aminosäuren, die bereits für die Synthese spinmarkierter Proteine eingesetzt wurden.	32
<i>Abbildung 32:</i> Festphasensynthese von RNA mittels Phosphoramiditen.....	33
<i>Abbildung 33:</i> Starre Spinlabel aus der Familie der C-Spins, bei welchen das Radikal durch eine Benzoylgruppe geschützt wurde.....	35
<i>Abbildung 34:</i> Spinmarkierte Nukleotide, die mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen sind....	35
<i>Abbildung 35:</i> Schematische Darstellung einer Ligation mittels T4 RNA Ligase II sowie mit Desoxyribozym.....	36
<i>Abbildung 36:</i> Strategie zur Darstellung langer spinmarkierter RNAs über ein erweitertes genetisches Alphabet.....	37
<i>Abbildung 37:</i> Strukturen für die beiden nichtkovalent bindenden Spinlabel \acute{G} und TMRS.....	37
<i>Abbildung 38:</i> Geschützte Spinlabel für Nukleinsäuren und Proteine.....	39
<i>Abbildung 39:</i> Geplante Syntheseroute für den auf Uridin basierenden photolabil geschützten Spinlabel 1	41
<i>Abbildung 40:</i> Synthese von <i>meso</i> -3,5-Dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on (5).....	41
<i>Abbildung 41:</i> Synthese von Verbindung 6	42
<i>Abbildung 42:</i> Synthese von Verbindung 7	42
<i>Abbildung 43:</i> Synthese der NBOM-Schutzgruppe ausgehend von <i>ortho</i> -Nitrobenzylalkohol über eine Pummerer-Umlagerung mit anschließender Chlorierung.....	43
<i>Abbildung 44:</i> Synthese des geschützten Spinlabel 8	43
<i>Abbildung 45:</i> Synthese des geschützten Aldehyds 9	44

<i>Abbildung 46:</i> Synthese von Alkin 2 über eine Seyfert–Gilbert–Homologisierung.....	45
<i>Abbildung 47:</i> Synthese von Alkin 2 über eine Peterson–Olefinierung.	45
<i>Abbildung 48:</i> 1,3–Dipolarecycloaddition als mögliche Nebenreaktion bei der Alkynsynthese.	46
<i>Abbildung 49:</i> Alternative Synthese für die Alkynfunktionalität ausgehend vom entsprechenden Aldehyd.....	46
<i>Abbildung 50:</i> Alternative Synthese für die Alkynfunktionalität ausgehend vom entsprechenden Aldehyd über eine Corey–Fuchs Reaktion.	47
<i>Abbildung 51:</i> Synthese von 5′–iodiertem Triacetyluridin 12 ausgehend von Uridin (10).	47
<i>Abbildung 52:</i> Synthese von Verbindung 14 aus acetyliertem 5′–Ioduridin 12	48
<i>Abbildung 53:</i> Geplante Synthese des 2′–geschützten TOM–Bausteins 13	48
<i>Abbildung 54:</i> Syntheseroute zur Darstellung des CEM–geschützten Zuckerbausteins 27	49
<i>Abbildung 55:</i> Synthese von Verbindung 24	50
<i>Abbildung 56:</i> Schützung von Verbindung 24 mit einer CEM–Gruppe in 2′–Position.	50
<i>Abbildung 57:</i> Synthese von Verbindung 27	51
<i>Abbildung 58:</i> Synthese des uridin–basierten Amiditbausteins 31	51
<i>Abbildung 59:</i> AE–Chromatogramm von RNA I nach der Entschützung der CEM–Gruppe mit TBAF in DMSO und Nitromethan.	52
<i>Abbildung 60:</i> Wahrscheinlicher Mechanismus der CEM–Entschützung mit Fluorid.....	53
<i>Abbildung 61:</i> Synthese von Verbindung 32	54
<i>Abbildung 62:</i> Synthese des TBDMS–geschützten Phosphoramidits 34	54
<i>Abbildung 63:</i> Syntheseroute für das cytidin–basierte Phosphoramidit 43	55
<i>Abbildung 64:</i> Synthese von Verbindung 37	56
<i>Abbildung 65:</i> Synthese von Verbindung 39	56
<i>Abbildung 66:</i> Synthese von Verbindung 41	57
<i>Abbildung 67:</i> Synthese des TBDMS–geschützten Phosphoramidits 43	57
<i>Abbildung 68:</i> Strukturen der palindromischen RNAs I–V	58
<i>Abbildung 69:</i> Overlay dreier HPLC–Chromatogramme derselben Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung.....	59
<i>Abbildung 70:</i> Natives Gel der palindromischen RNA III	60
<i>Abbildung 71:</i> PELDOR–Messung von RNA III	60

<i>Abbildung 72:</i> Verschiedene Varianten des Neomycin–Aptamers.	61
<i>Abbildung 73:</i> PELDOR–Messung von RNA VI	62
<i>Abbildung 74:</i> Sekundärstrukturuntersuchung mittels in–line probing der RNAs IX und X	63
<i>Abbildung 75:</i> Sekundärstruktur des Neomycin Aptamers in An– und Abwesenheit eines Liganden.	64
<i>Abbildung 76:</i> Strukturvorschlag für eine neue Schutzgruppe, die nach der Bestrahlung leicht eliminiert wird.	65
<i>Abbildung 77:</i> Syntheseroute für die Darstellung des photolabil geschützten Lysinderivats 51 ausgehend von Lysin (45).	67
<i>Abbildung 78:</i> Darstellung von Verbindung 46	68
<i>Abbildung 79:</i> Synthese von Verbindung 48	69
<i>Abbildung 80:</i> Synthese von Verbindung 44	69
<i>Abbildung 81:</i> Synthese des photolabil geschützten Lysinderivats 50	70
<i>Abbildung 82:</i> Entschützung von Verbindung 50 zu Verbindung 51	70
<i>Abbildung 83:</i> cw–Messung des entschützten Lysinderivats 51	71
<i>Abbildung 84:</i> Vorschlag für ein zweigeteiltes Lysinderivat, welches erst nach der Proteinbiosynthese komplettiert wird.	72
<i>Abbildung 85:</i> Syntheseroute für die Darstellung des ohne Kupfer „clickbaren“ Dibenzocyclooctinspinlabel rac–62	73
<i>Abbildung 86:</i> Synthese von Verbindung 55	73
<i>Abbildung 87:</i> Darstellung des Regioisomerenmischungs 56a/56b über eine Wolff–artige Umlagerung.	74
<i>Abbildung 88:</i> ¹ H–NMR des farblosen Feststoffes 56	75
<i>Abbildung 89:</i> ¹ H–NMR des farblosen Öls 56	75
<i>Abbildung 90:</i> Reduktion des Ketons 56a/56b zu Verbindung rac–57a/57b	76
<i>Abbildung 91:</i> Darstellung von Verbindung rac–58a/58b	76
<i>Abbildung 92:</i> Baseninduzierte Eliminierung des Vinylbromids rac–58a/58b zum entsprechenden Alkin rac–59	77
<i>Abbildung 93:</i> TBDMS–Entschützung von rac–59 mit dem TBAF–Trihydrat zum freien Alkohol rac–60	77
<i>Abbildung 94:</i> Schutzgruppenfreie Eliminierung von Hydrobromid mittels LDA.	78
<i>Abbildung 95:</i> Verknüpfung des Linkers mit dem TPA–Spinlabel über eine Steglichveresterung.	78

<i>Abbildung 96:</i> cw-Messung von Verbindung rac-62	79
<i>Abbildung 97:</i> Alternativstrukturen für weiterführende Experimente bei den „clickbaren“ Spinlabeln.	79
<i>Abbildung 98:</i> Syntheseroute zur Darstellung eine Phenylalaninderivates mit Tetramethylisindolinspinlabel über eine stereoselektive Phasentransferreaktion.....	81
<i>Abbildung 99:</i> Synthese von Verbindung 64 über eine Kondensation mit Benzylamin.....	82
<i>Abbildung 100:</i> Einführung der vier Methylgruppen zur Stabilisierung des späteren Radikals mittels Grignard-Reaktion.	82
<i>Abbildung 101:</i> Synthese des Nitroxidradikals 67 über das freie Amin 66 ausgehend vom benzylierten Amin 65	83
<i>Abbildung 102:</i> Darstellung von Verbindung 68 ausgehend vom Nitroxidradikal 67	83
<i>Abbildung 103:</i> Radikalische Bromierung von Verbindung 68	83
<i>Abbildung 104:</i> Synthese des O'Donell-Imin 72	84
<i>Abbildung 105:</i> Prinzip einer asymmetrischen Alkylierung aktiver Methylenverbindungen mittels Phasentransferkatalyse am Beispiel einer Glycin-Schiff-Base.	84
<i>Abbildung 106:</i> Strukturen der Myers-Auxiliare Pseudoephedrin (77) und Pseudoephenamin (78). .	85
<i>Abbildung 107:</i> Syntheseroute zur Darstellung eine Phenylalaninderivates mit Tetramethylisindolinspinlabel über eine Myers-Alkylierung.	86
<i>Abbildung 108:</i> Synthese des Methyliminobenzils (80) ausgehend von Benzil (79) mit anschließender Reduktion zu Verbindung 81	87
<i>Abbildung 109:</i> Trennung des Stereomengemischs durch Kristallisation mit Mandelsäure.....	87
<i>Abbildung 110:</i> Synthese von (S,S)-(+)-Pseudoephedrin-Glycinamid (90).....	89
<i>Abbildung 111:</i> Deprotonierung von Verbindung 90 erzeugt das gewünschte Enolat 92 nach dem Equilibrieren bei 0 °C.	89
<i>Abbildung 112:</i> Synthese eines Phenylalaninderivats 93 über eine Myers-Alkylierung.	90
<i>Abbildung 113:</i> Nebenreaktion, der Myers Alkylierung von 90 bei Verwendung von mehr als 2.0 Äquivalenten LDA.	91
<i>Abbildung 114:</i> Syntheseroute zur Darstellung eine Phenylalaninderivates mit Tetramethylisindolinspinlabel über eine Negishi-Kupplung.	92
<i>Abbildung 115:</i> Synthese von Verbindung 98 ausgehend von Phthalsäureanhydrid (96).....	93
<i>Abbildung 116:</i> Verschiedene Bromierungen zur Darstellung von Verbindung 99	93
<i>Abbildung 117:</i> Verknüpfung der beiden Bausteine 100 und 99 über eine Negishi-Kupplung mit SPhos als Ligand unter Bildung des Phenylalaninderivats 96	94

<i>Abbildung 118:</i> Synthese von Verbindung 103 ausgehend von 101 über Oxidation zu Verbindung 102 mit anschließender Verseifung des Methylesters.....	94
<i>Abbildung 119:</i> Geplante Synthese zur Darstellung eines photolabil geschützten Phenylalaninderivats 104	95
<i>Abbildung 120:</i> Mögliche Syntheseroute zur Darstellung eines Phenylalaninderivats über stereoselektive Hydrierung.	96
<i>Abbildung 121:</i> Selbstregeneration von Chiralität nach Dellaria <i>et al.</i> zur Synthese von Aminosäuren.	97
<i>Abbildung 122:</i> Struktur des eingesetzten terminalen Alkins X1 sowie des Cy5–Azids X2	97
<i>Abbildung 123:</i> Sekundärstrukturen der synthetisierten RNA–Stränge.	174
<i>Abbildung 124:</i> RP–HPLC und Massenspektren der isolierten RNA–Stränge I , VI , VII und VIII	175
<i>Abbildung 125:</i> RP–HPLC und Massenspektren der bestrahlten RNA–Proben.	177
<i>Abbildung 126:</i> Natives PAGE–Gel von RNA III in verschiedenen Konzentrationen mit NUPACK–Voraussage.	178
<i>Abbildung 127:</i> RP–HPLC–Chromatogramme nach Click–Reaktion der Spin–markierten RNAs XIII und IX	180
<i>Abbildung 128:</i> In–line probing von RNA XIII und IX bei verschiedenen Temperaturen.....	181
<i>Abbildung 129:</i> cw–Spektrum vom Neomycin–Aptamer XI und der palindromischen RNA–Sequenz III	182
<i>Abbildung 130:</i> cw–Spektrum von Verbindung rac–62 und Verbindung 51	182
<i>Abbildung 131:</i> Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA III	183
<i>Abbildung 132:</i> Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI . Die Probe wurde für 20 min bei 0 °C gelagert, bevor sie mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde.	184
<i>Abbildung 133:</i> Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI : Kontrollexperiment Nr. 1. Die Probe wurde bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde.	184
<i>Abbildung 134:</i> Ergebnisse der DeerAnalysis von RNA XI : Kontrollexperiment Nr. 2. Die Probe wurde für acht Tage bei –20 °C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurde.	185
<i>Abbildung 135:</i> Schmelzkurven von RNA I und RNA III	187
<i>Abbildung 136:</i> Schmelzkurven von RNA VII und RNA VII mit Neomycin B.....	188
<i>Abbildung 137:</i> Schmelzkurven von RNA XII und RNA XII mit Neomycin B.	189

7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i> Unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Schützung von 7 mit NBOM.....	44
<i>Tabelle 2:</i> Synthetisierte palindromische RNA-Sequenz I.	52
<i>Tabelle 3:</i> cw-Messungen des Palindroms sowohl direkt nach der Entschützung als auch mit einem Abstand von zwei Stunden bei unterschiedlichen pH-Werten [4.2, 7.4, 8.5].	59
<i>Tabelle 4:</i> Einfluss unterschiedlicher Reduktionen auf das Diastereomerenverhältnis von Verbindung 81	87
<i>Tabelle 5:</i> Kristallisationsbedingungen für Verbindung 81 mit (R)-Mandelsäure.	88
<i>Tabelle 6:</i> Verschiedene Versuchsansätze der Deprotonierung von Pseudoephedrin-Glycinamid 90 . 90	
<i>Tabelle 7:</i> Übersicht der verwendeten NMR-Spektrometer und Messfrequenzen.	98
<i>Tabelle 8:</i> Übersicht der δ -Werte und deren Multiplizitäten der verwendeten deuterierten Lösungsmittel im ^1H -Spektrum.....	99
<i>Tabelle 9:</i> Übersicht der δ -Werte und deren Multiplizitäten der verwendeten deuterierten Lösungsmittel im ^{13}C -Spektrum.....	99
<i>Tabelle 10:</i> Synthetisierte RNA-Stränge und deren Modifikation.....	174
<i>Tabelle 11:</i> Annealingprotokoll für markierte RNA-Proben.	176
<i>Tabelle 12:</i> Verwendete Reagenzien zur Konjugation von Cy5-Azid mit den RNA-Proben VII und XII	179
<i>Tabelle 13:</i> Zusammenstellung der einzelnen Schmelzpunkte sowie der daraus resultierende Schmelzpunkt inklusive Standardabweichung.	186

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen übernommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Datum

Unterschrift (Frank Kaiser)

9 Publikationsliste

F. Kaiser, B. Endeward, A. Collauto, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Spin-Labeled Riboswitch Synthesized from a Protected TPA Phosphoramidite Building Block*, Chem. Eur. J. **2022**, 56, e202201822

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Frank Marius Kaiser
Geburtsdatum	15.02.1992
Geburtsort	Bad Soden am Taunus

Akademischer Werdegang

11/2017 – 06/2023	Promotion im Fach Chemie Goethe-Universität Frankfurt am Main bei Prof. Göbel im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
10/2015 – 09/2017	Master of Science in Chemie (1.0) Goethe-Universität Frankfurt am Main bei Prof. Göbel Titel der Abschlussarbeit: Die Catellani-Reaktion als Zugang zu neuen Peptid-Aggregationshemmern (1.0)
10/2012 – 09/2015	Bachelor of Science in Chemie (1.7) Goethe-Universität Frankfurt am Main bei Dr. Hengesbach Titel der Abschlussarbeit: Rekonstitution von H/ACA RNP-Komplexen (1.3)

Bildungsweg

03/2003 – 06/2011	Allgemeine Hochschulreife (1.8) Heinrich-Böll-Schule Hattersheim am Main
-------------------	--